

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Bernd Kaspers

Angefertigt in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikum
rechts der Isar der Technischen Universität München
(PD Dr. med. Güralp O. Ceyhan)

**Der Einfluss des Chemokins Fractalkin auf den Schweregrad
der Entzündungsreaktion, der Fibrogenese und des
abdominellen Schmerzes bei der experimentellen akuten und
chronischen Pankreatitis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Tom D`Haese
aus Essen
München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

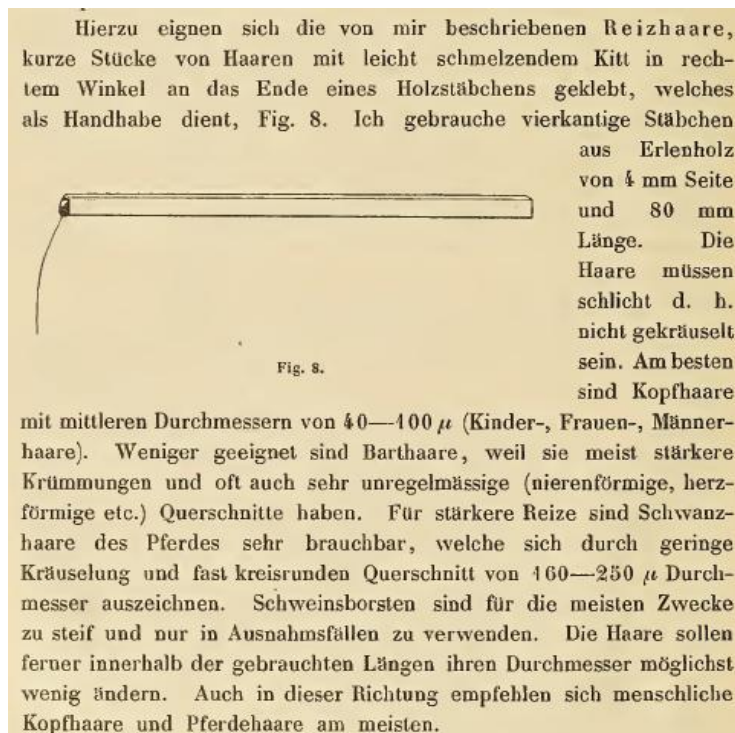
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Gewidmet

Max Ruppert Franz von Frey

(* 16. November 1852; † 25. Januar 1932)



Ausschnitt aus:

Untersuchung über die Sinnes Functionen der Menschlichen Haut

Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz,

von Max von Frey

Des XXIII. Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften, 1896

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATURÜBERSICHT	4
2.1 PANKREATITIS VERLAUFSFORMEN.....	4
2.1.1 Akute Pankreatitis	4
2.1.1.1 Ätiologie.....	5
2.1.1.2 Pathogenese.....	5
2.1.2 Chronische Pankreatitis.....	6
2.1.2.1 Ätiologie.....	7
2.1.2.2 Pathogenese.....	8
2.2 THERAPEUTISCHE ANSÄTZE	10
2.2.1 Therapie der akuten Pankreatitis.....	10
2.2.2 Therapie der chronischen Pankreatitis	11
2.3 PANKREATITIS BEIM KLEINTIER	12
2.3.1 Ätiologie	13
2.3.2 Symptome	13
2.3.3 Diagnose	14
2.3.4 Therapie & Prognose	15
2.4 FRACTALKIN.....	16
2.4.1 Fractalkin im Krankheitsprozess	18
2.4.2 Fractalkin und Schmerz.....	20
2.4.3 Fractalkin und Pankreatitis	21
3 MATERIAL UND METHODEN.....	24
3.1 MATERIALIEN.....	24
3.1.1 Apparaturen	24
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	25
3.1.3 Chemikalien.....	25
3.1.4 Antikörper	28
3.1.5 Versuchstiere.....	28
3.1.6 Software	29
3.2 METHODEN	29

3.2.1 Tierexperimenteller Teil	29
3.2.1.1 Versuchstiere	29
3.2.1.2 Caerulein induziertes Pankreatitismodell	30
3.2.1.3 Induktion der akuten und chronischen Pankreatitis	30
3.2.1.4 Open-Field-Test	33
3.2.1.5 Evoziertes Schmerzverhalten (Von-Frey-Filamenten).....	34
3.2.1.6 Gewinnung der Gewebeproben des Pankreas	35
3.2.2 Histologische und molekularbiologische Untersuchungen.....	36
3.2.3.1 Histologische Aufarbeitung der Gewebeproben	36
3.2.3.2 CX3CR1 knock-out	37
3.2.3.3 Spormann-score.....	37
3.2.3.4 Ödembestimmung im Pankreasgewebe.....	38
3.2.3.5 Bestimmung der intrapankreatischen Vakuolisierung	38
3.2.3.6 Serum α -Amylase und Lipase Werte	39
3.2.3.7 Anilin Färbung des Bindegewebes	39
3.2.3.8 Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA.....	39
3.2.3.9 Immunhistochemie p-ERK	41
3.2.3.10 Western Blot p-ERK	42
3.2.3.11 Elektronen Mikroskopische Untersuchung	43
3.3 STATISTIK	43
4 ERGEBNISSE	45
4.1 STRUKTURELLE ANALYSE DER PATHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN BEI EXPERIMENTELL INDUZierter AKUTEN UND CHRONISCHEN PANKREATITIS.....	45
4.1.1 Makroskopische Veränderungen	45
4.1.2 Histopathomorphologische Veränderungen	46
4.1.2.1 Intrapankreatische Vakuolisierung	49
4.1.2.2 Fibrotische Aktivität in der chronischen Pankreatitis	50
4.1.2.3 α -SMA Fibroblasten Aktivierung.....	51
4.1.3 Elektronenmikroskopische Analysen	52
4.2 ÖDEMBESTIMMUNG IM PANKREASGEWEBE	60
4.3 AMYLASE UND LIPASE IM SERUM	61
4.4 HISTOPATHOMORPHOLOGISCHE ANALYSE VIA SPORMANNSCORE.....	62
4.5 VERHALTENS BIOLOGISCHE STUDIEN BEI AKUTER PANKREATITIS	63
4.5.1 Open-Field-Test	63

4.5.2	Evoziertes Schmerzverhalten (Von-Frey-Filamente)	66
4.5.3	Körpergewichtsverlust	70
4.6	VERHALTENS BIOLOGISCHE STUDIEN BEI CHRONISCHER PANKREATITIS ..	71
4.6.1	Open-Field-Test	71
4.6.2	Evoziertes Schmerzverhalten (Von-Frey-Filamente)	73
4.6.3	Gewichtszunahme	76
4.7	ANALYSE DER SCHMERZ ASSOZIIERTEN NEURONALEN AKTIVITÄT	77
5	DISKUSSION	80
5.1	EINFLUß DES FRACTALKIN-REZEPTORS AUF DIE ENTZÜNDUNGSREAKTION	80
5.2	EINFLUß DES FRACTALKIN-REZEPTORS AUF DIE FIBROGENESE	84
5.3	EINFLUß DES FRACTALKIN-REZEPTORS AUF DIE SCHMERZEN	86
6	ZUSAMMENFASSUNG	92
7	SUMMARY	94
8	LITERATURVERZEICHNIS	96
9	ANHANG	115
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	115
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
9.3	TABELLENVERZEICHNIS	120
9.4	DANKSAGUNG	121

1 Einleitung

Die Pankreatitis zählt zu den häufigsten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes (Mayerle et al., 2004). Sie wird in eine akute und chronische Form unterteilt.

In der akuten Pankreatitis (AP) werden zwei verschiedene Formen unterschieden. Während nach einer akuten, milden Pankreatitis (interstitiell-ödematöse Form 80-85%) eine meist vollständige Genesung beobachtet wird (*restitutio ad integrum*), kann es bei der schweren Form (hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis bei 15-20%), zu einem exokrinen und endokrinen Funktionsverlust kommen. Durch häufig schwere lokale und systemische Komplikationen kann die Mortalitätsrate bis zu 20-30% reichen (Schmid et al., 1999, de Beaux et al., 1995). Erhöhter Alkoholkonsum und eine hyperkalorische Ernährung mit oft assoziierten Gallenwegserkrankungen sind die häufigsten Ursachen einer akuten Pankreatitis (Schneider et al., 2009, Lankisch et al., 1996, Jacobs et al., 1977). Die Frühphase der Krankheit ist durch eine ausgeprägte Aktivierung des Immunsystems gekennzeichnet. Dabei kommt es zur gezielten Infiltration des Pankreas mit Entzündungszellen (u.a. Leukozyten, Makrophagen) und Freisetzung von diversen Chemokinen und Zytokinen. Diese Überstimulation des Immunsystems führt nicht selten zur SIRS (*systemic inflammatory response syndrom*), die weiterführend zu diversen Organschäden bis letztlich zum Multiorganversagen führen kann (Tenner et al., 1997, Bhatia et al., 2000, Saluja and Steer, 1999, Brady et al., 1999).

Im Gegensatz zu der akuten Pankreatitis ist die chronische Pankreatitis (CP) durch einen langjährigen Verlauf gekennzeichnet, welcher meist durch repetitive akute Schübe verbunden ist. Durch die typischen Azinuszellatrophien und den charakteristischen fibrotischen Umbau des gesamten Organs kommt es im Verlauf der Erkrankung meist zu einer ausgeprägten endo- und exokrinen Pankreasinsuffizienz (Etemad and Whitcomb, 2001, Tattersall et al., 2008).

Bei der akuten und chronischen Pankreatitis ist der abdominale Schmerz das absolute Leitsymptom. Der Pankreatitis-Schmerz beginnt meist plötzlich und behält seine starke Intensität über Stunden und Tage (Sand and Nordback, 2011, Büchler MW, 1996, Goebell H and MV, 1995). Die therapeutische Gabe von nicht-steroidalen Antiphlogistika und sogar Opioide führt bei diesen extremen

Schmerzen öfters zu keiner befriedigenden Schmerzfreiheit.

Das Chemokin Fractalkin ist im Pankreasgewebe bei Patienten mit chronischer Pankreatitis deutlich überexprimiert (Ceyhan et al., 2009b). Fractalkin führt zu einer gesteigerten Infiltration von Entzündungszellen mit deutlich verstärkter pankreatischer Neuritis und ist mit einer Steigerung der typischen abdominalen Schmerzen assoziiert (Ceyhan et al., 2009b). Lange ist man bei der chronischen Pankreatitis von einem rein „entzündlichen“ Schmerz ausgegangen. Neuere Studien deuten jedoch auch auf eine neuropathische Komponente des chronischen Schmerzes hin (Ceyhan et al., 2009a, Ceyhan et al., 2008). In einigen tierexperimentellen Modellen für neuropathischen Schmerz konnte eine Überexpression von Fractalkin in Hinterhornganglienzellen und in spinalen Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Lindia et al., 2005, Verge et al., 2004, Cardona et al., 2006). Durch neutralisierende Antikörper für CX3CR1 konnte in einigen Studien eine deutliche Schmerzreduktion gezeigt werden (Milligan et al., 2004, Sun et al., 2007, Johnston et al., 2004), wohingegen in einer anderen Studie intraneurale Injektionen von Fractalkin in den Nervus ischiadicus ebenfalls zu einer Schmerzreduzierung führte (Holmes et al., 2008).

Die chronische Pankreatitis ist mit einer ausgeprägten Fibrogenese verbunden. Durch das Einwandern von Entzündungszellen werden sogenannte pankreatische Sternzellen (PSC, pankreatische Stellatum Zellen) aktiviert. Diese produzieren und sezernieren extrazelluläre Proteine wie Kollagen aber auch pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine (Ceyhan et al., 2009b, Kloppel et al., 2004, Omary et al., 2007). Hierbei gelten die Chemokine CCL2 und Fractalkin als fibrogene Faktoren (Koziolk et al., 2007, Wasmuth et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Fractalkin bzw. CX3CR1 im pankreatischen, renalen und hepatischen Gewebe zu einer Zunahme der entzündlichen Reaktionen und des fibrotischen Gewebeumbaus führte (Ceyhan et al., 2009b, D'Haese et al., 2010, Furuichi et al., 2006, Koziolk et al., 2007, Wasmuth et al., 2008).

Fractalkin bindet ausschließlich und selektiv an den Rezeptor CX3CR1. Dementsprechend erscheint das Chemokin Fractalkin und sein Rezeptor besonders geeignet um durch Blockade mit spezifischen Antikörpern sowohl die Entzündungsreaktion, die Fibrogenese als auch das Schmerzempfinden bei der akuten und chronischen Pankreatitis positiv beeinflussen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es daher, durch den Einsatz von CX3CR1^{-/-} knock-out Mäusen und durch Blockade des Fractalkin Rezeptors mit kommerziell erwerblichen CX3CR1 Antikörpern, die Rolle des Chemokins Fractalkin und dessen Rezeptor bei der experimentellen akuten und chronischen Pankreatitis zu charakterisieren. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag dabei bei den Veränderungen der pankreatischen Entzündungsreaktion, des pankreatischen Schmerzes und der Fibrose.

2 Literaturübersicht

2.1 Pankreatitis Verlaufsformen

2.1.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis wird definiert als eine akute Entzündung der Bauchspeicheldrüse mit variablem Befall benachbarter Gewebe oder anderer Organsysteme (Lerch et al., 1995, Schmid et al., 1999, Tenner et al., 1997). In den meisten Fällen (etwa 85%) nimmt die Krankheit einen leichten Verlauf (interstitiell-ödematöse Form) mit minimaler Organdysfunktion und kompletter Rückbildung der klinischen Symptome, als auch der morphologischen Veränderungen. In einer kleinen Gruppe von Patienten (etwa 15%) verläuft das Krankheitsbild schwerer (hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis). Häufig durch die Folgen zumindest einer organischen bzw. systemischen Komplikation kommt es zum Multiorganversagen, dass nicht selten den Tode zur Folge hat (Büchler MW, 1996).

Die interstitiell-ödematöse Form (milde Form) wird oft von einem gering ausgeprägten retropankreatischen Fettgewebsnekrosensaum und einer retroperitonealen Flüssigkeitsexsudation begleitet. Durch diese Flüssigkeitsansammlung kann es, nach etwa 4 Wochen, zur Bildung von Pseudozysten kommen (Büchler MW, 1996).

Die nekrotisierende Pankreatitis (schwere Form) ist durch intra- und extrapankreatische Fettgewebsnekrosen und Parenchymnekrosen mit Einblutungen gekennzeichnet. Diese nekrotisierten Gebiete können steril bleiben oder sich sekundär infizieren, wodurch der klinische Verlauf maßgeblich beeinflusst wird. Die Form der Schädigung kann lokal oder diffus das gesamte Organ betreffen. Nach 4 bis 6 Wochen können Pseudozysten und Pankreasabszesse die Folge des akuten Ereignisses sein (Büchler MW, 1996).

Die interstitiell-ödematösen Pankreatitis ist meist selbstlimitierend. Innerhalb von 4 bis 12 Wochen kommt es zur kompletten Erholung der Drüsenfunktion. Nach einer hämorrhagisch- nekrotisierenden Pankreatitis bleibt bei etwa 50% der Patienten eine ausgeprägte Reduktion der exokrinen bzw. endokrinen Funktion (Büchler MW, 1996).

2.1.1.1 Ätiologie

Allgemein können die möglichen ätiologischen Ursachen in toxische, metabolische, mechanische, vaskuläre und infektiöse Ursachen eingeteilt werden (Büchler MW, 1996). Aus einer langen Liste möglicher auslösender Faktoren der akuten Pankreatitis stechen überhöhter Alkoholkonsum und das Vorliegen von Gallensteinen heraus. Diese beiden ätiologischen Faktoren sind zu 80-90% die Ursache der akuten Pankreatitis. Bei der alkoholischen Genese der akuten Pankreatitis ist primär das männliche Geschlecht zwischen dem 30. und 45. Lebensjahr betroffen. Die biliäre Genese der akuten Pankreatitis findet sich hingegen eher in der Altersgruppe zwischen 50-70 Jahren mit einer Häufung beim weiblichen Geschlecht.

Zu den toxischen, metabolischen Ursachen zählen neben Alkohol die Hyperlipoproteinnämie, die Hyperkalzämie, der Hyperparathyreoidismus und verschiedene Medikamente wie Sulfonamide, Tetrazykline, Furosemid und andere (Büchler MW, 1996; Schmidt and Creutzfeldt, 1970).

Mechanische Ursachen sind neben den Gallensteinen postoperative anatomische Veränderungen im Bereich von Magen und Gallenwegen, Traumen oder Pankreasgangobstruktionen durch Tumoren oder die post-ERCP-Pankreatitis (Büchler MW, 1996).

2.1.1.2 Pathogenese

Die meist verbreitete Theorie sieht die Ursache der akuten Pankreatitis in der Schädigung von Azinuszellen durch Autodigestion aufgrund unphysiologischer intrapankreatischer Aktivierung der Verdauungsenzyme (Khokhar and Seidner, 2004; Lerch and Gorelick, 2000). In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin der entscheidende Auslöser für die vorzeitige intrapankreatische Aktivierung der Enzymkaskade ist (Grady et al., 1998; Hofbauer et al., 1998; Kruger et al., 1998). Gegen diese Selbstverdauung der Bauchspeicheldrüse ist die pankreatische Azinuszelle mit einer Anzahl von Schutzmechanismen ausgestattet. Die Speicherung der

Proenzyme in speziellen Zellorganellen, den Zymogengranula, um Kontakt mit dem Zytosol zu vermeiden, ist der Haupt Schutzmechanismus. Außerdem werden Proteasen mit einem Peptid am C-Terminus synthetisiert, dass eine Aktivierung so lange verhindert, bis es durch die Enterokinase im Dünndarm abgespalten wird. Desweiteren umschließen Proteaseninhibitoren (z.B. α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, PSTI) die Verdauungsenzyme und werden mit ihnen in den Darm transportiert, so dass selbst eine frühzeitige Aktivierung von Proteasen keinen Zellschaden anrichten kann.

Trotz dieser Schutzvorkehrungen kommt es in der Initialphase der akuten Pankreatitis zur frühzeitigen intrazellulären Aktivierung von digestiven Proteasen im Pankreas. In der Anfangsphase der akuten Pankreatitis ist die Verdauungsenzymproduktion unverändert, allerdings ist die exokrine Sekretion der digestiven Proteasen blockiert. Dadurch kommt es innerhalb des Azinuszellverbandes zu einer Anreicherung von Lysosomen und Proteasen in den Zymogengranula. Die direkte Zellschädigung läuft über Auflösung der normalen Zellkompartimentierung. Durch die Verschmelzung von Zymogengranula mit den inaktiven Enzymvorstufen (Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Pro-Elastase, Lipase) und den lysosomalen Hydrolasen (Cathepsin-B), kommt es zu einer Aktivierung der intrazellulären Pankreasproenzyme, die zu einer Schädigung der Azinuszelle und letztendlich zur Auslösung einer akuten Pankreatitis führt (Adler et al., 1982, Klar and Werner, 2000, Lampel and Kern, 1977, Leach et al., 1991, Steer, 1998).

2.1.2 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis wird definiert als eine fortschreitende inflammatorische Krankheit, charakterisiert durch irreversible morphologische Veränderungen mit typischen rezidivierenden oder persistierenden Schmerzen und/oder permanentem Funktionsverlust des Organs (Etemad and Whitcomb, 2001).

Klinisch kann die Erstmanifestation einer chronischen Pankreatitis häufig nicht von einer akuten Pankreatitis unterschieden werden. Die Organfunktion muss nicht von Anfang an reduziert sein. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf wird aber sowohl die exokrine als auch die endokrine Funktion stark kompromittiert.

Nach einem langjährigen Verlauf kommt es zu einer Globalinsuffizienz des Pankreas (Ammann and Muellhaupt, 1994). Das Risiko für die Ausbildung eines Pankreaskarzinoms ist in dieser Phase der Krankheit erhöht (Krejs, 2010). Durch die große Reservekapazität des Organs, müssen bereits 80% des pankreatischen Gewebes zerstört sein, um mit den üblichen klinischen Tests die eingeschränkte Funktion nachweisen zu können (Ammann and Muellhaupt, 1994, Foitzik and Buhr, 1997).

Die Klinik der chronischen Pankreatitis ist durch rezidivierende quälende Schmerzepisoden gekennzeichnet. Die Patienten müssen häufig hospitalisiert werden, erlangen häufig eine Medikamentenabhängigkeit und sind meist kachektisch. Mit zunehmender fortschreitender Erkrankung im Spätstadium treten fast nahezu immer Malabsorptionsstörungen mit Steatorrhö und Diabetes mellitus auf (Büchler MW, 1996).

Morphologische Charakteristika sind Azinuszellatrophien, eine massive Leukozyteninfiltration in das pankreatische Parenchym sowie eine irreversible Fibrosierung des Pankreasgewebes (Tattersall et al., 2008, Mayerle et al., 2004). Durch zunehmende Destruktion des exokrinen Parenchyms kommt es im fortgeschrittenen Stadium der chronischen Pankreatitis häufig zu intra-, als auch extrapancreatischen Verkalkungen, den sog. „Kalkspritzern“ (Ammann and Muellhaupt, 1994, Foitzik and Buhr, 1997).

2.1.2.1 Ätiologie

Ein wesentlicher Auslöser (70-80%) für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis ist ein langjähriger Alkoholabusus, betroffen sind vorrangig Männer im Alter von 20–50 Jahren (Ammann, 2001). Zusätzliche Einflüsse wie genetische, umweltbedingte und immunologische Faktoren sind aber wohl zur Manifestation einer CP notwendig (Uomo and Manes, 2007). In etwa 10% der Fälle sind allein hereditäre, autoimmune und Gangobstruktion-induzierte Faktoren die Ursache für eine CP (Etemad and Whitcomb, 2001, Tattersall et al., 2008). Für die idiopathische Pankreatitis (20 %) gibt es keine Erklärung über den pathophysiologischen Ablauf (Steer et al., 1995). Von Comfort und Steinberg wurden 1952 erstmals genetische Prädispositionen für die chronische Pankreatitis erwähnt (Comfort and Steinberg, 1952). Der häufigste Gendefekt in der

hereditären Pankreatitis betrifft das kationische Trypsinogen-Gen *PRSSI* (Whitcomb et al., 1996), dessen Expressionsprodukt zu den am häufigsten synthetisierten Enzymen von Azinuszellen gehört. Mutationen im *PRSSI*-Gen verstärken die Autoaktivierung von Trypsinogen oder verhindern die Inaktivierung, so dass der für eine Pankreatitis typische Selbstverdau begünstigt wird (Whitcomb et al., 1996).

Die Autoimmunpankreatitis (AIP) ist eine seltene Erkrankung und liegt bei etwa 2% der chronischen Pankreatitiden vor. Bei einem Teil der Patienten findet sich im Serum ein erhöhtes IgG, Subtyp 4 und/oder Antikörper gegen Carboanhydrase. Hierbei finden sich häufig auch autoimmunologisch bedingte Veränderungen an den Gallenwegen und Speicheldrüsen. Auch andere Autoimmunkrankheiten (Leber, Schilddrüsen, Nieren etc.) können assoziiert sein. Es besteht eine Neigung zur Fibrosebildung, die sich auch an anderen mit betroffenen Organen manifestiert (z. B. sklerosierende Cholangitis oder Sialadenitis, Sjögren Syndrom, retroperitoneale Fibrose). Vielfach wird angenommen, dass die AIP eine pankreatische Manifestation einer systemischen immunkomplexvermittelten fibrosierenden Systemkrankheit ist, die durch IgG4 vermittelt wird (Deshpande et al., 2006, Kamisawa and Okamoto, 2006).

2.1.2.2 Pathogenese

Ätiologisch, morphologisch und klinisch ist die chronische Pankreatitis relativ gut untersucht. Durch ein komplexes Zusammenspiel von proteolytischen Enzymen, Wachstumsfaktoren, inflammatorischen Mediatoren und dem Immunsystem ist die Pathogenese allerdings in vieler Hinsicht nicht eindeutig. Durch wiederholte akute Pankreatitisschübe schreitet die Erkrankung der chronischen Pankreatitis weiter fort und chronifiziert sich (Etemad and Whitcomb, 2001, Stevens et al., 2004). Wie bei der akuten Pankreatitis kommt es zur Schädigung der pankreatischen Azinuszellen aufgrund unphysiologischer Aktivierung der Verdauungsenzyme (Khokhar and Seidner, 2004, Lerch and Gorelick, 2000). Die Protease vermittelte Selbstverdauung führt zur Zerstörung der zellulären Strukturen, es kommt zur Ausbildung eines Entzündungsgeschehens mit Rekrutierung von Immunzellen und Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen. Durch einen fortdauernden entzündlichen Prozess entwickeln sich

irreversible morphologische Veränderungen wie Fibrose und Atrophien des Parenchyms (Büchler MW, 1996).

Es werden verschiedene Hypothesen diskutiert, die zu dieser pathologischen Situation führen:

I. Braganza et. al. beschreibt die *Oxidative Stress Theorie*. Hierbei werden große Mengen an toxischen Metaboliten von den hepatischen Oxidasen nicht mehr ausreichend neutralisiert. Beim Alkoholmetabolismus können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Diese Sauerstoffradikale gelangen über den Blutkreislauf oder den Gallensaft in das Pankreas, wo sie die Schädigung von Zellmembranen durch Lipidoxidation sowie eine Destabilisierung von Lysosomen und Zymogengranula bewirken (Braganza, 1983). Der oxidative Stress scheint eine Rolle bei den Entzündungsreaktionen zu spielen, jedoch sind sich die meisten Kritiker heutzutage einig, dass dieses Phänomen alleine keine Pankreatitis auslösen bzw. eine chronische Pankreatitis entwickeln kann (Yoshida et al., 1995).

II. Die *toxisch- metabolische Theorie* sieht die schädigende Wirkung direkt durch die Alkohol-Metaboliten, Fettsäureethylester und Acetaldehyd, die durch Lipidablagerungen und Membranveränderungen unmittelbar die Azini schädigen und somit eine Entzündungskaskade im Pankreas auslösen (Bordalo et al., 1977).

III. Nach der *Gangobstruktions Theorie* von Sarles liegt die Ursache in einer gestörten sekretorischen Funktion der Azinuszellen (Sarles, 1986). Langjähriger Alkoholmissbrauch führt zu einer Abnahme der pankreatischen Bikarbonat- und Wassersekretion und gleichzeitig zu einer Zunahme der Protein und Kalziumkonzentration. Die Veränderungen erhöhen die Viskosität des Pankreassekrets, wodurch es zu Proteinablagerungen (Protein Plaques) in dem Pankreasgängen kommt, die mit der Zeit kalzifizieren und pankreatische Gangsteine bilden. Durch Obstruktion der Gangsysteme kommt es zu Dilatation, Gangepithelproliferation und anschließender Azinusatrophie mit Ausbildung von fibrotischem Ersatzgewebe (Sarles, 1986, Khokhar and Seidner, 2004, Büchler MW, 1996).

IV. Klöppel et al. formuliert die *Nekrose-Fibrose-Theorie* als Ursache der CP durch rezidivierende Schübe akuter Pankreatiden. Durch intraparenchymale Proteasenaktivierung und damit assoziierte Leukozyteninfiltrationen resultieren

fokale Pankreasgewebsnekrosen. Das nekrotische Gewebe wird durch Bindegewebe ersetzt und die anschließende Fibrosierung führt zur Narbenbildung mit Gangstrikturen (Kloppel and Maillet, 1992).

V. Die sogenannte SAPE-Theorie („*sentinel acute pancreatitis event*“) beschreibt als initiales Ereignis eine schwere akute Pankreatitis (Whitcomb et al., 1996). Die Auswirkungen sind so schwerwiegend, dass Leukozyten rekrutiert werden, pro- und anti-inflammatorische Zytokine sezernieren und pankreatische Sternzellen (PSC, *pancreatic stellate cells*) zur Kollagensynthese aktiviert werden. Das anhaltende Entzündungsgeschehen führt letztendlich zur Ausbildung einer chronischen Pankreatitis (Whitcomb et al., 1996).

2.2 Therapeutische Ansätze

2.2.1 Therapie der akuten Pankreatitis

Die Behandlung der akuten Pankreatitis erfolgt rein symptomatisch. Sämtliche Ansätze zur kausalen oder spezifischen Therapie der akuten Pankreatitis sind bislang fehlgeschlagen. Grundlage jeder konservativen Therapie ist die initiale Nahrungskarenz. In schwereren Fällen ist die Platzierung einer Magensonde zur Ableitung der Sekrete des oberen Verdauungstraktes und Aufrechterhaltung der enteralen Ernährung notwendig. Bei der akuten Pankreatitis kommt es peripankreatisch und retroperitoneal zu Ödembildung, wodurch der Patient pro Tag 2 bis 10 Liter Flüssigkeit verlieren kann, welche denn entsprechend ersetzt werden müssen. Infusionstherapie mit kristalloiden Lösungen, evtl. Plasmaersatzstoffe werden empfohlen (Solanki and Barreto, 2011). Wichtig ist die Schmerztherapie, da eine akute Pankreatitis mit erheblichen Schmerzen verbunden ist. Dies wird in der Regel durch i.v. Gabe von Opiaten versucht. In der Regel wird eine kontrollierte Periduralanästhesie notwendig um die extremen Schmerzen zu lindern (Pezzilli et al., 2010).

2.2.2 Therapie der chronische Pankreatitis

Die einzige Therapie, die auch eine Linderung der Schmerzen bewirkt, ist das strikte Alkoholverbot mit Pankreasschonkost. Einzelne Studien konnten auch eine Schmerzlinderung durch die Gabe von Pankreasenzymen nachweisen. Die Wirkung wird auf einen sekretionshemmenden Feedback-Mechanismus zurückgeführt (Dominguez-Munoz, 2011). Als Schmerz-therapeutische Maßnahmen werden zentral wirkende Analgetika eingesetzt (Braganza et al., 2011).

Chirurgisch operative Eingriffe können bei einem Großteil der Patienten mit schmerzhafter chronischer Pankreatitis zu nachhaltiger Schmerzfreiheit führen und sind endoskopischen Verfahren überlegen. Bei der klassischen Pankreaskopfresektion nach Kausch-Whipple wird der Pankreaskopf, das Duodenum, der distale Gallengang inklusive der Gallenblase sowie ein Drittel des Magens entfernt. Die Rekonstruktion des Gallenganges erfolgt über eine sog. Hepatikojejunostomie (biliodigestive Anastomose), das Restpankreas wird über eine Pankreatikojejunostomie, der Magen über eine Gastrojejunostomie rekonstruiert. Diese Operation wird bei Tumorerkrankungen des Pankreaskopfes sowie bei der chronischen Pankreatitis angewendet (Traverso and Longmire, 1978, Friess et al., 2002).

Aufgrund von relativ hohen postoperativen Raten von gastrointestinalen Beschwerden und Diabetes Mellitus wurde die klassische Kausch-Whipple Operation heute weitgehend durch die pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion abgelöst, welche 1978 von Traverso und Longmire eingeführt wurde (Traverso and Longmire, 1978). Der Unterschied zur klassischen Pankreaskopfresektion besteht darin, dass auf die teilweise Entfernung des Magens verzichtet werden kann. Hierbei ist die physiologische Magenentleerung durch den Erhalt der Magenpfortnerfunktion erhalten. Dieses Operationsverfahren hat sich in den letzten Jahren als gleichwertiges Resektionsverfahren neben der klassischen Pankreaskopfresektion nach Kausch-Whipple etabliert. Die pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion wird bei Tumorerkrankungen des Bauchspeicheldrüsenkopfes und bei der chronischen Pankreatitis durchgeführt.

Die duodenumerhaltenden Pankreaskopfresektionen werden nur bei gutartigen Raumforderungen und bei der chronischen Pankreatitis durchgeführt. Hierbei wird der Kopf der Bauchspeicheldrüse unter Erhalt des Duodenums entfernt. Durch den Verzicht auf die Entfernung des Duodenums kann von der Neuanlage einer Verbindung der Bauchspeicheldrüse mit dem Dünndarm abgesehen werden und somit die physiologische Darmpassage beibehalten werden (Beger et al., 1990, Muller et al., 1997).

Kommt es im Rahmen einer chronischen Pankreatitis zur Ausbildung von Zysten (Pankreaspseudozysten), kann eine Drainage dieser Pseudozysten nötig werden, wenn die Zysten durch ihre Größe die Nahrungspassage behindern. Diese Operation wird als Zystojejunostomie bezeichnet. Dabei wird die Zyste chirurgisch eröffnet und eine Dünndarmschlinge auf die eröffnete Zystenwand genäht. Nach der Durchführung dieser Operation wird die Zystenflüssigkeit somit kontinuierlich in den Dünndarm drainiert.

Die Hauptindikation für die Einlage eines Stents in den Gallen- und/oder Pankreasgang sind Gangstenosen. Stenosen sowohl des Pankreas als auch des intrapankreatischen Gallenganges entstehen durch die zunehmende Fibrose des Gewebes und sind bei kalzifizierenden Verlaufsformen besonders ausgeprägt. Ihr Auftreten ist eng mit der Schmerzsymptomatik der Patienten verbunden. Aus großen randomisiert kontrollierten Studien wissen wir heute jedoch, dass die chirurgische Therapie der chronischen Pankreatitis effektiver und nachhaltiger als die endoskopische Therapie ist. Aus diesem Grunde muss die chirurgische Therapie bei der komplizierten chronischen Pankreatitis heute als Standardtherapie angesehen werden.

2.3 Pankreatitis beim Kleintier

Erkrankungen des exokrinen Pankreas sind häufig. In einer retrospektiven Studie von Hänichen & Minkus (1990) zur Pathologie der Erkrankung des exokrinen Pankreas wurden beim Hund insgesamt 9.342 Pankreata untersucht. Bei 1,73% wurden Veränderungen festgestellt, die als nosologisch bedeutsam eingestuft wurden. Pankreatitis war die häufigste Veränderung (1,03%), gefolgt vom Pankreaskarzinom (0,43%). Das Vorliegen von Pankreasatrophien (0,21%) deutet

auf eine Pankreatitis hin, erlaubt aber keine definitive Diagnose (Hänichen T, 1990). In der gleichen Studie wurden 6.504 feline Pankreata untersucht. Hierbei zeigten 1,3% aller Katzenpankreatata bedeutsame Veränderungen. Pankreatitis war auch diesmal mit 0,6% die häufigste Veränderung, gefolgt vom Pankreaskarzinom mit 0,4%. Die Daten sind allerdings teilweise widersprüchlich zu klinischen Beobachtungen, in denen Pankreaskarzinome weit weniger häufig diagnostiziert werden als Pankreasatrophien (Suter P. F, 2006 Georg Thieme Verlag, Nelson R. W., 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag).

2.3.1 Ätiologie

Die Ätiologie der Pankreatitis bleibt beim Kleintier meist ungeklärt. Als Risikofaktoren, die häufiger beim Hund als bei der Katze vorkommen, gelten fettreiche Mahlzeiten, lokale Durchblutungsstörungen (während Anästhesie oder Schock), Hyperkalzämie, Traumata (Verkehrsunfälle) und die Einnahme einiger Medikamente (Cholinesteraseinhibitoren, Kalzium, Östrogene, Salizylate, Thiaziddiuretika, Vinkaalkaloide). Weitere Faktoren sind Obstruktionen des Drüsenabflusses durch den Pankreasegel *Opisthorchis felineus*, durch Adenokarzinome oder als Komplikation nach einer Resektion des proximalen Duodenums. Bei der Katze können außerdem Cholangitis und Infektionen mit Toxoplasmose oder FIP (Feline-Infektiöse-Peritonitis) ätiologisch in Betracht gezogen werden (Nelson R. W., 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag).

2.3.2 Symptome

Die Klinischen Symptome variieren je nach Schweregrad der Erkrankung. Hunde und Katzen zeigen meist unspezifische Symptome, die eine Diagnose erschweren. Bei leicht erkrankten Patienten sind Anorexie, Depression, Polyphagie, Erbrechen, schmerzhaftes Abdomen die am meisten beschriebenen Symptome. Bei hochgradig erkrankten Tieren werden schweres akutes Erbrechen, hämorrhagische Diarrhö und Schock mit Todesfolge beobachtet (Nelson R. W., 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, Suter P. F, 2006 Georg Thieme Verlag, Horzinek M.C. , 2005 Gerog Thieme Verlag, Steiner, 2006). In einer Studie von 70 Hunden mit schwerwiegender akuter Pankreatitis berichtet Hess et al. über

Anorexie zu 91%, Vomitus 90%, Schwäche 79%, abdominale Schmerzen 58%, Dehydratation 46% und Diarrhö bei 33% (Hess et al., 1998). Abdominale Schmerzen gelten in der Humanmedizin als absolutes Leitsymptom, aufgrund fehlender spezifischen Studien zum Schmerzverhalten beim Kleintier, müssten nach Steiner weitaus mehr Tiere als beschrieben an Schmerzen leiden (Abb.1) (Steiner, 2006). Durch die häufig unspezifischen Symptome, sollten seiner Meinung nach Vomitus, Anorexie und abdominaler Schmerz beim Hund als Hauptsymptome betrachtet werden (Steiner, 2006).



Abbildung 1: Hund mit Pankreatitis, (A) typische kyphotische Haltung durch Schmerzen im kranialen Abdomen und Angstverhalten durch Schwanzklemmen, (B) Die für eine Pankreatitis typische Gebetshaltung „praying position“ bei starkem abdominalen Schmerz. (Foto: Tom D’Haese, Tierarztpraxis Dr. Stampa)

Die Symptomatik der akuten Pankreatitis, wie sie beim Hund beschrieben wird, ist bei der Katze selten. Bei Katzen verläuft eine Pankreatitis meistens subklinisch (Nelson R. W., 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag). Nach einer Studie von Hill et al., wurden bei etwa einem Drittel der Katzen, bei denen eine nekrotisierende akute Pankreatitis nachgewiesen wurde, histopathologische Hinweise auf eine chronische Pankreatitis festgestellt (Hill and Van Winkle, 1993). Aufgrund der anatomischen Beziehung zwischen Pankreas und Leber bei der Katze und oft beschriebenen gemeinsamen Auftretens von Cholangitis, IBD (*Inflammatory-Bowel-Disease*) und Pankreatitis, wird die Pankreatitis nur selten als Einzelerkrankung diagnostiziert. (Nelson R. W., 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag).

2.3.3 Diagnose

Der erste diagnostische Schritt bei Hund und Katze sind Röntgenaufnahmen des Abdomens, gefolgt von Einleitung der Laboruntersuchungen. Es gibt keine pathognomonischen, radiologischen Anzeichen für eine Pankreatitis, aber Befunde die auf eine lokalisierte Peritonitis hinweisen erhärten den Verdacht einer akuten Pankreatitis. Häufig beobachtete Laborveränderungen, die allerdings keine definitive Diagnose erlauben sind Leukozytose, Leberenzymerrhöhung, Hyperglykämie, Hypokalzämie und Hypercholesterolämie. Erhöhte Serum Amylase und Lipase Aktivität galt lange Zeit als spezifisch, neuere Studien zeigten aber, dass 50% aller Hunde mit erhöhten Amylase und Lipase Werten keine Pankreatitis hatten (Steiner, 2006). Neue Tests, mit spezifischen Antikörpern nur gegen die Pankreaslipase, wie *canine Pancreatic Lipase Immunoreactivity* (cPLI) bzw. *feline Pancreatic Lipase Immunoreactivity* (fPLI) gelten als hoch spezifisch für eine akute Pankreatitis bei Hund und Katze (Simpson et al., 1991, Steiner, 2006, Forman et al., 2004). Die Ultraschalluntersuchung ist beim Hund oft aussagekräftig. Hypoechogenität in der Pankreasregion und peripankreatischen Gegend, erweiterter Gallengang und lokaler Abdominalerguss (Aszites) gilt als spezifischer Nachweis einer akuten Pankreatitis. Die Sensitivität der Ultraschalluntersuchung bei Katzen ist sehr gering. Durch eine diagnostische Laparotomie mit Biopsieentnahme, ist bei der Katze eine sichere Diagnose möglich (Suter P. F, 2006 Georg Thieme Verlag, Nelson R. W., 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, Horzinek M.C. , 2005 Georg Thieme Verlag, Steiner, 2006).

2.3.4 Therapie & Prognose

Eine akute Pankreatitis ist eine potentiell lebensbedrohliche Krankheit. Die klassische symptomatische Therapie umfasst eine aggressive intravenöse Flüssigkeitstherapie, oralen Futter- und Wasserentzug und analgetische Medikation (Fentanylpflaster). Die Dehydratation wird durch eine bilanzierte Elektrolytlösung in ausreichender Menge ausgeglichen. Jegliche orale Verabreichung sollte strikt vermieden werden. Wenn möglich wird auch der Anblick und Geruch von Futter vermieden, denn bereits dadurch wird eine pankreatische Sekretion hervorgerufen. Nach einigen Tagen des Fastens können

kleine Portionen mit äußerst fettarmer Diät angeboten werden. Katzen sollten nicht fasten, da die Gefahr der hepatischen Lipidose zu groß ist. Anorektischen Katzen muss eine Nasenschlund-, Ösophagus- oder Magensonde gelegt werden (Nelson R. W., 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag).

In schwereren Fällen sollte ein Breitspektrumantibiotikum parenteral verabreicht werden, um einer Infektion vorzubeugen (Nelson R. W., 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag). Bei persistierendem Erbrechen können zentralwirksame Antiemetika zum Einsatz kommen. Wenn nach sieben Tagen keine Besserung eintritt, der Verdacht eines Pankreasabzess, einer Neoplasie oder Obstruktion des Gallengangs besteht, muss chirurgisch eingegriffen werden. Eine rezidivierende oder chronische Pankreatitis wird durch ein striktes Fütterungsmanagement therapiert. Hierbei ist eine fettarme und kohlenhydratreiche Diät mit mittlerem Proteingehalt lebenslang notwendig. Bei Hund und Katze mit gesicherter Diagnose einer chronischen Pankreatitis ist die Substitution von Pankreasenzymen möglich. Wenn eine ausgeprägte exokrine oder endokrine Insuffizienz vorliegt, ist die Gabe von Insulin und Pankreasenzymen indiziert (Nelson R. W., 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, Suter P. F, 2006 Georg Thieme Verlag).

Die Prognose hängt vor allem vom Schweregrad der extrapankreatischen Komplikationen ab. Patienten, bei denen es zu systemischen Komplikationen wie disseminierter intravasaler Gerinnung und/oder zum Multiorganversagen kommt, haben eine infauste Prognose. Bei milden Verlaufsformen ist die Prognose günstig (Suter P. F, 2006 Georg Thieme Verlag).

2.4 Fractalkin

Chemokine sind eine Gruppe von kleinen Signalproteinen, die bei inflammatorischen Vorgängen eine Chemotaxis bei Immunzellen auslösen (Zlotnik and Yoshie, 2000). Der Begriff Chemokine ist eine Kurzform für chemotaktische Zytokine, und bezieht sich auf ihre chemotaktische Wirkung auf Immunzellen. Chemokine werden aufgrund der Anordnung ihrer Cysteinreste allgemein in vier Gruppen (C, CC, CXC, CX3C) eingeteilt (Zlotnik and Yoshie, 2000). Bei der vierten Gruppe, der CX3C Gruppe, gibt es nur einen einzigen

Vertreter, das Fractalkin. Dieses wurde von Bazan erstmals sequenziert und kloniert (Bazan et al., 1997). Das Chemokin Fractalkin ist in verschiedener Hinsicht ungewöhnlich. Es kann membranständig oder in löslicher Form vorkommen (Bazan et al., 1997). Die membrangebundene Form steigert bei Endothelzellen die Adhäsion an das Endothel und die transendotheliale Migration von Lymphozyten, die den Rezeptor CX3CR1 exprimieren und wirkt dabei als Adhäsionsmolekül. Das lösliche Fractalkin agiert wie ein chemischer Lockstoff, der die Migration und Extravasation von zytotoxischen Lymphozyten und Makrophagen in entzündetes Gewebe induziert (Imai et al., 1997) (Abb.3). Fractalkin bindet selektiv an seinen hochspezifischen G-protein-gekoppelten Rezeptor CX3CR1 (Abb.2).

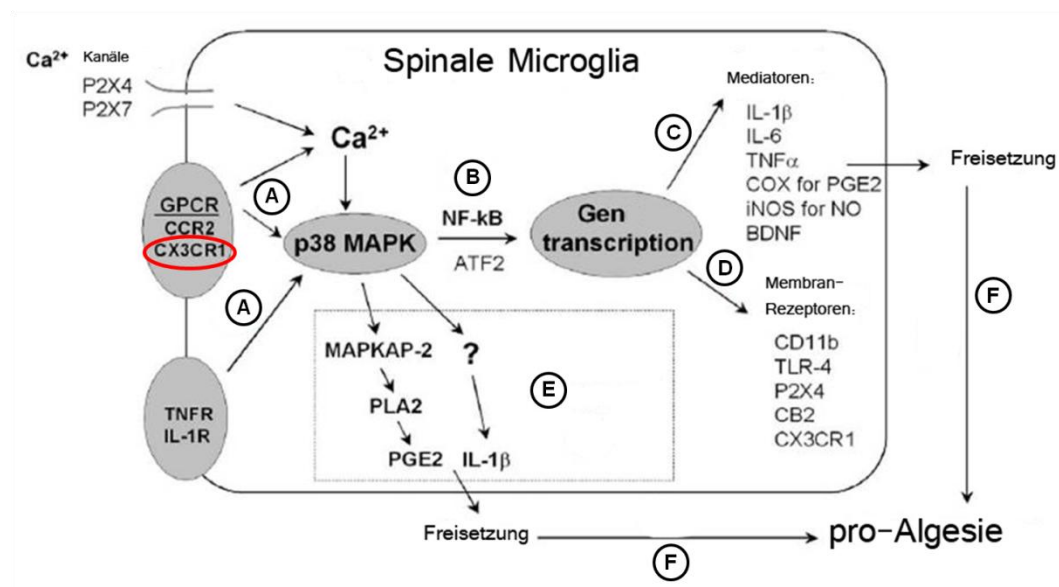


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion in spinaler Microglia nach Nervenstimulation modifiziert von (Ji and Suter, 2007). Nach Fractalkin-CX3CR1 Interaktion wird p38-MAPK aktiviert (A). Durch diese Aktivierung resultieren gesteigerte Expressionen von Transkriptionsfaktoren (NF-kB, ATF-2) (B) wodurch wiederum inflammatorische Mediatoren und Wachstumsfaktoren (IL-1β, IL-6, TNFα, COX, iNOS, BDNF) sezerniert werden (C) und die Membran-Rezeptor Expression erhöhen (CD11b, TLR-4, P2x4, CB2, CX3CR1) (D). Außerdem induziert p38-MAPK die Freisetzung von PGE2 und IL-1β durch schnelle posttranslationale Regulation (E). Die Freisetzung dieser Mediatoren sensibilisiert nociceptive Hinterhorn-Neuronen und führen zu persistierender Schmerz Hypersensibilisierung (F).

Der Fractalkin-Rezeptor kommt auf zytotoxischen T-Killerzellen, T-Zellen, Makrophagen, Microglia im Hinterhorn des Rückenmarks, glialen Sattelitzellen der Spinalganglien und auf glatter Gefäßmuskulatur vor (Imai et al., 1997). Fractalkin ist neben CCL2 das einzige Chemokin, das von spinalen Neuronen und sensorischen Afferenzen exprimiert wird (Hughes et al., 2002, Verge et al., 2004).

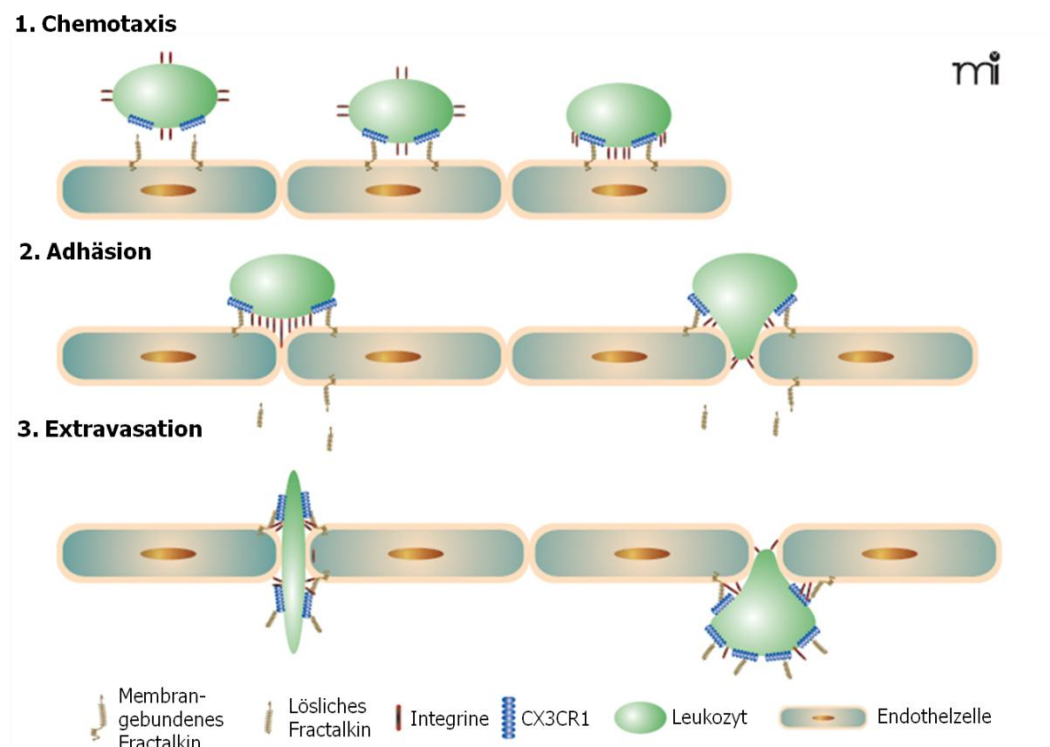


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Fractalkin vermittelten Chemotaxis von Leukozyten, modifiziert von (Jones et al., 2010). Das membrangebundene Fractalkin steigert bei Endothelzellen die Adhäsion von Leukozyten, die den Rezeptor CX3CR1 exprimieren (1). Die Interaktion zwischen Fractalkin und CX3CR1 verstärkt die Integrinaffinität, wodurch eine festere Adhäsion entsteht (2) und die transendotheliale Migration in das entzündete Gewebe ermöglicht (3).

2.4.1 Fractalkin im Krankheitsprozess

Bei Verletzungen und Entzündungen übernehmen Chemokine eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung, Adhäsion und Migration von Entzündungszellen. Erst in jüngster Literatur wird Fractalkin mit der Pathogenese von chronischer Pankreatitis (Ceyhan et al., 2009b, Yasuda et al., 2008), Arteriosklerose (Yang et al., 2007), rheumatischer Arthritis (Blaschke et al., 2003, Blaschke and Muller, 2008), Glomerulonephritis (Segeer et al., 2002, Inoue et al., 2005), Asthma allergica (Bisset and Schmid-Grendelmeier, 2005), Morbus Crohn (Brand et al., 2006) und neuropathischen Schmerzen (Zhuang et al., 2007, Lindia et al., 2005, Verge et al., 2004, Holmes et al., 2008) in Zusammenhang gebracht (Abb. 4).

In einigen Studien wurde gezeigt, dass Fractalkin ein wichtiger Mediator für die

Leukozyten-Akkumulation und die Wanderung von Zellen der glatten Muskulatur bei der Arteriosklerose darstellt (Apostolakis et al., 2007, Lucas et al., 2003, Saederup et al., 2008, Galkina and Ley, 2007). Combadiere und Kollegen zeigten eine signifikant reduzierte arteriosklerotische Gefäßveränderung bei doppel knock-out-Mäusen für CX3CR1 und das Apolipoprotein-E (Combadiere et al., 2003). Bei Patienten mit Angina pectoris wurden erhöhte Plasmawerte für Fractalkin und den Rezeptor festgestellt, die nach einer aggressiven Statin Therapie signifikant reduziert werden konnten (Damas et al., 2005).

Eine Überexpression von Fractalkin in Th1-Zellen in kultivierten synovialen Fibroblasten lässt eine pro-inflammatorische Rolle in der Pathogenese von rheumatischer Arthritis vermuten. In dieser Studie wurde eine Expression von Fractalkin besonders in CD68⁺ synovialen Makrophagen, CD1a⁺ dendritische Zellen und im geringeren Maße in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen. Außerdem wurde der Fractalkin Rezeptor in synovialen Makrophagen, dendritischen Zellen, CD3⁺ T-Zellen und synovialen Fibroblasten festgestellt (Blaschke and Muller, 2008).

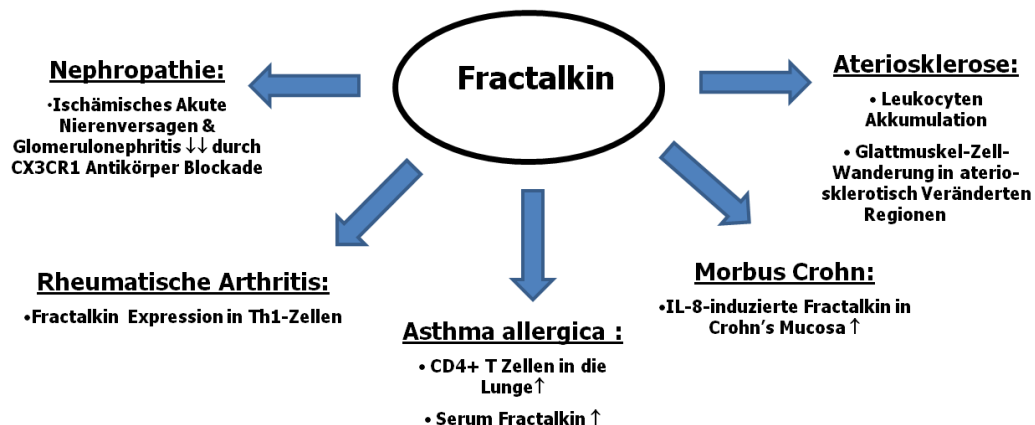


Abbildung 4: Multiple Rolle des Fractalkin im Krankheitsprozess.

Oh und Kollegen berichteten kürzlich über eine Fractalkin Überexpression im renalen Endothel und von protektiven Effekten durch den Abbau von Makrophagen bei ischämischen akuten Nierenversagen in Mäusen (Oh et al., 2008). Durch CX3CR1 Antikörper Blockade konnte eine Reduzierung der Makrophagen-Infiltration in die ischämischen Areale und eine verminderte renale Fibrose erzielt werden (Furuichi et al., 2006). Die Untersuchung der infiltrierten Leukozyten bei einer Glomerulonephritis oder anderen Nephropathien ergab, dass

die überwiegende Anzahl an Entzündungszellen CX3CR1 exprimieren (Seegerer et al., 2002).

Chemokine beeinflussen entscheidend die Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in das Lungengewebe bei Asthma allergica (Bisset and Schmid-Grendelmeier, 2005). In Patienten mit Asthma allergica und Patienten mit Rhinitis wurden erhöhte lösliche Fractalkin-Konzentrationen im peripheren Blut nachgewiesen. Der Fractalkin Rezeptor war in CD4⁺ T-Zellen hochreguliert (Rimaniol et al., 2003).

In Patienten mit Morbus Crohn wurde ein signifikanter Anstieg der mRNA für Fractalkin im entzündeten Bereich der Mucosa festgestellt. Die Expression wurde hoch reguliert durch pro-inflammatorische Zytokine, vor allen IL-8 (Brand et al., 2006).

2.4.2 Fractalkin und Schmerzen

Erste Studien zeigten eine deutliche Fractalkin- und Rezeptor-Expression im Nervensystem und vor allem in der Mikroglia. Aufgrund der nachgewiesenen Rolle der Mikroglia in der Schmerzentstehung wurde über eine mögliche Rolle von Fractalkin bei der Neuro-Microglia Kommunikation spekuliert (Nishiyori et al., 1998). Durch Stimulation von sensorischen Afferenzen und Rückenmarksneuronen, wird das membranständige Fractalkin abgespalten und wird so als lösliches Chemokin freigesetzt (Milligan et al., 2004). In einigen Experimenten zu neuropathischem Schmerz konnte gezeigt werden, dass eine Fractalkin Freisetzung von Hinterhorn ganglien (DRG) mit einer CX3CR1 Überexpression in der spinalen Mikroglia und nachfolgendem neuropathischen Schmerzverhalten korreliert (Abb.5) (Lindia et al., 2005, Verge et al., 2004, Cardona et al., 2006). Bei Injektionen von Fractalkin in die periaqueductale Graue Substanz vom Gehirn, konnte ein pro-nociceptiver Effekt beobachtet werden (Chen et al., 2007). Die durch Fractalkin erhöhte Schmerzwahrnehmung wird wahrscheinlich durch in der Mikroglia freigesetzte p38-MAPK vermittelt, ein Faktor der bekannterweise neuropathischen Schmerz induziert (Zhuang et al., 2007). Diese Ergebnisse konnten die zentrale Rolle der Fractalkin/CX3CR1-Achse für die neurogliale Kommunikation bei nociceptiven Prozessen bestätigen (Lindia et al., 2005, Verge et al., 2004, Zhuang et al., 2007, Sun et al., 2007). Durch neutralisierende Antikörper gegen CX3CR1 konnte eine deutliche

Schmerzreduktion in experimentellen neuropathischen Tiermodellen gezeigt werden (Milligan et al., 2004, Sun et al., 2007, Johnston et al., 2004).

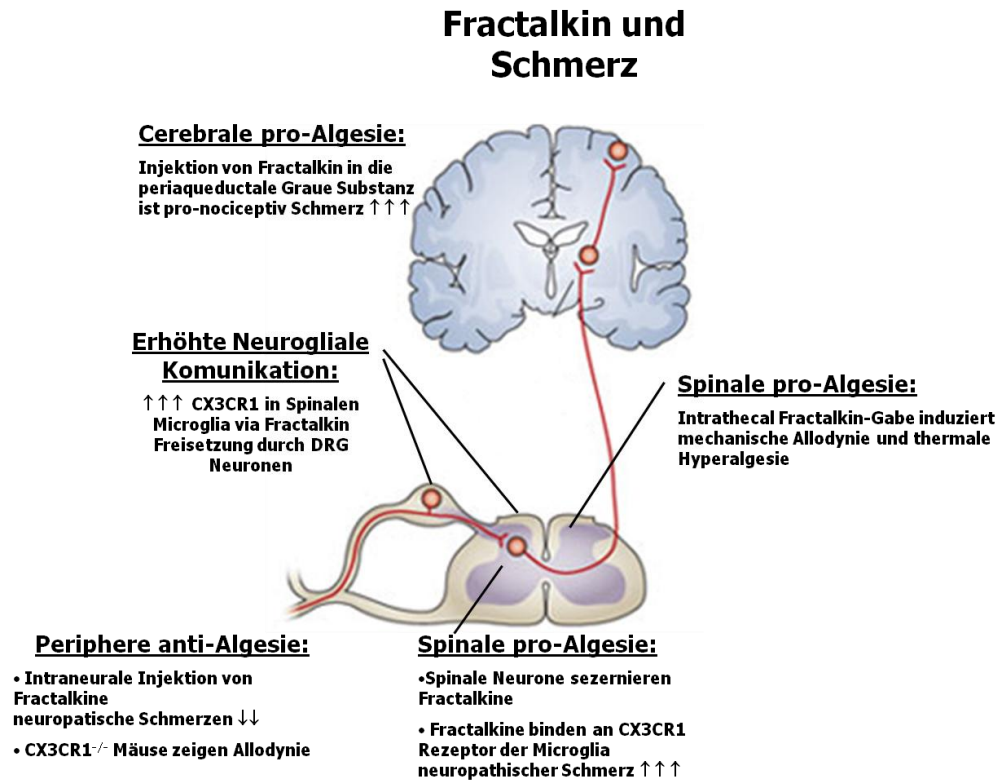


Abbildung 5: Beteiligung von Fractalkin und CX3CR1 im zentralen und peripheren neuropathischen Schmerzmechanismus, modifiziert von (Fischer and Waxman, 2010).

Im Gegensatz dazu, führten intraneurale Injektionen von Fractalkin in den Nervus ischiadicus zu einer Reduzierung der mit neuropathischen Schmerz verbundenen Verhaltensweisen bei Mäusen. Im gleichen Versuch zeigten CX3CR1^{-/-} knock-out-Mäuse ausgeprägte Allodynie (Holmes et al., 2008).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse zwischen zentral pro-algetischer und peripher anti-algetischer Wirkung sind bis heute nicht vollständig verstanden, zeigen jedoch die deutliche schmerzmodulierende Eigenschaft der Fractalkin/CX3CR1-Achse (D'Haese et al., 2010).

2.4.3 Fractalkin und Pankreatitis

Pankreatitis ist histopathologisch durch Lymphozyten und Makrophagen Immigration, Fibrose und perineuronale Entzündungszellinfiltration (pankreatische Neuritis) gekennzeichnet. Charakteristisch für die chronische

Pankreatitis sind vor allem neuroplastische Phänomene, die letztlich zu Veränderungen in der Nervenmorphologie führen und eine spezifische pankreatische Neuropathie erzeugen (Ceyhan et al., 2009a, Drewes et al., 2008, Ceyhan et al., 2010, Demir et al., 2010). Diese besteht charakteristischerweise aus einer schwerwiegenden pankreatischen Neuritis, begleitet mit einer neuronalen Hypertrophie und einer deutlichen Steigerung der neuronalen Dichte. (Ceyhan et al., 2009a).

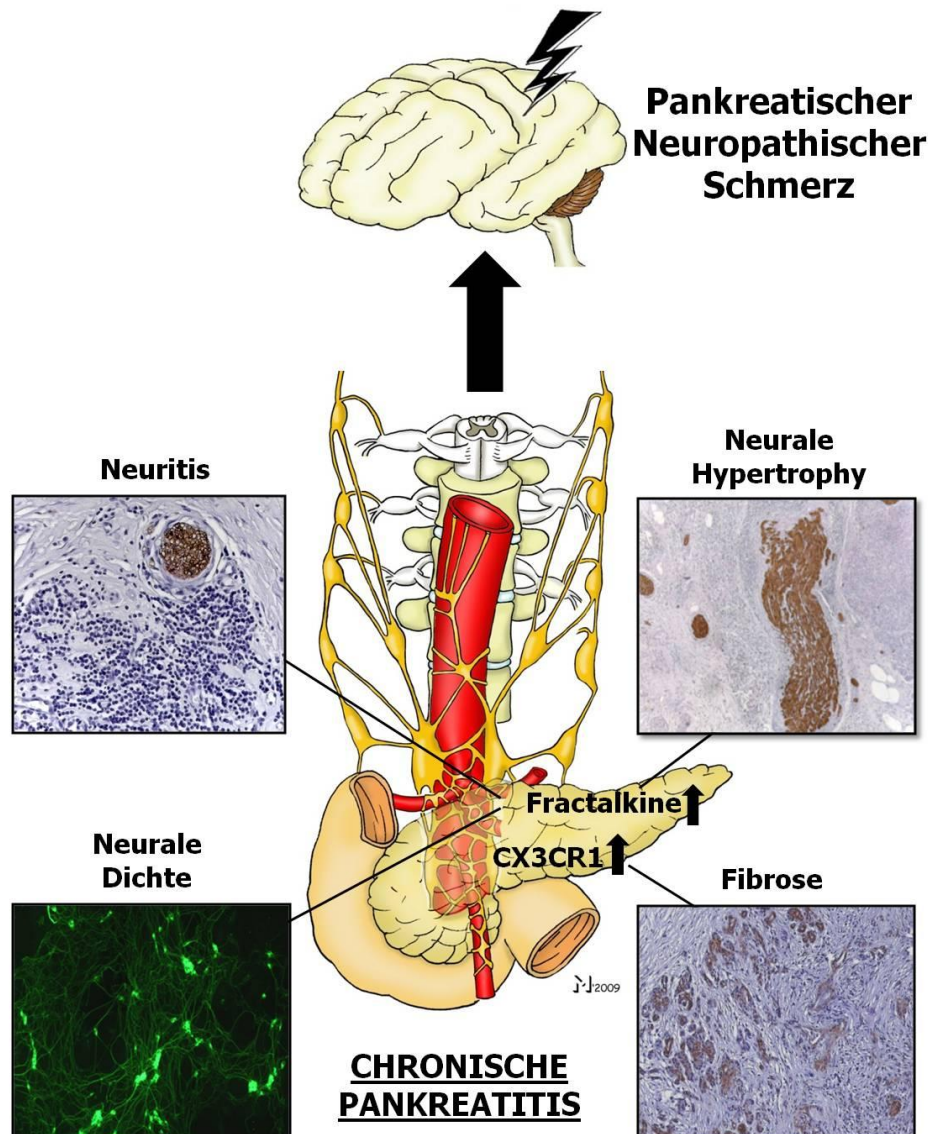


Abbildung 6: Einfluss von Fraktalkin und CX3CR1 in der chronischen Pankreatitis, modifiziert von D'Haese et al. Fraktalkin und CX3CR1 wird mit verschiedenen histopathologischen Phänomenen der chronischen Pankreatitis in Zusammenhang gebracht. Erhöhte Fraktalkin expressionen in CP-Gewebe korreliert mit dem Schweregrad der pankreatischen Neuritis, Fibrose und Schmerzempfinden.

Neuste Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe von Güralp Ceyhan und Kollegen zeigten, dass der Schweregrad aller histopathologischen Phänomene der Pankreatitis mit der Fractalkin-Expression stark korreliert (Abb.6). Die Basisexpression wurde für Fractalkin und Rezeptor in Gewebeproben aus gesundem Pankreata ermittelt. In Patienten mit chronischer Pankreatitis konnten im Pankreasgewebe signifikant höhere mRNA- und Proteinkonzentrationen durch Analyse mit qRT-PCR und Western Blot festgestellt werden. Bemerkenswert war zudem die signifikante Korrelation von Fractalkin und Rezeptor zu den Schmerzen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis (Ceyhan et al., 2009b). Je schwerwiegender die pankreatische Neuritis, die neuronale Dichte und Hypertrophie, desto unerträglicher beschrieben die Patienten ihre Schmerzen (Ceyhan et al., 2009b, Ceyhan et al., 2009a, Ceyhan et al., 2010).

Das Verständnis der pankreatischen Fibrose wurde maßgeblich durch die Isolierung und Charakterisierung der pankreatischen Stern-Zellen (PSCs) beeinflusst. Sternzellen haben eine Schlüsselfunktion in der Fibrogenese (Apte et al., 1998, Bachem et al., 1998). Sie sind ortsgebundene Zellen des Pankreas und auf der basolateralen Seite der Azinus-Zelle lokalisiert. Durch entzündliche Prozesse werden PSCs durch einwandernde Entzündungszellen aktiviert und transformieren zu Zellen mit einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, die wie glatte Muskulatur α -Aktin (α -SMA) exprimieren (Vonlaufen et al., 2008). Diese aktivierten PSC produzieren und sezernieren extrazelluläre Proteine wie Kollagen 1 und 2, Fibronectin, Laminin und pro-inflammatorische Chemokine (Omary et al., 2007, Kloppel et al., 2004). Im Speziellen gelten die Chemokine CCL2 (formerly monocyte chemoattractant protein-1, MCP1) und Fractalkin als Fibrose-bildende Faktoren (Koziolk et al., 2007, Wasmuth et al., 2008). Studien zeigten eine signifikante Überexpression von CX3CR1 in Nieren- und Leberfibrose (Wasmuth et al., 2008, Koziolk et al., 2007). Außerdem wurde von einer gesteigerten Zellmotilität in human renalen Fibroblasten durch Fractalkin berichtet (Koziolk et al., 2007).

Die Literaturrecherche verdeutlicht die multiple Funktion des Chemokins Fractalkin und Rezeptor im Krankheitsprozess. Im Versuchsvorhaben soll nun die Frage beantwortet werden, welchen genauen Einfluss das Fractalkin und sein Rezeptor CX3CR1 auf die Entzündungsreaktionen, die Fibrogenese und die Schmerzentstehung bei der akuten und chronischen Pankreatitis hat.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Apparaturen

Trockenschrank	UNB 400 Memmert GmbH + CoKG (Schwabach, GER)
Waage	Analytic AC 210 S, Sartorius (Ulm, GER)
Vortexer	IKA Works, INC., MS 1 Minishaker, (Wilmington, USA)
Magnetrührstab	MSI-Minishaker, Num: 03014906, IKAWorks, Inc. (Wilmington, USA)
Kamera	Leica MPS 60, (Wetzlar, GER)
Mikroskop	Olympus IX50 Inverse-Microscope, (Hamburg, GER) Zeiss Axioplan 2, (Oberkochen, GER)
Stereomikroskop	Olympus SZX7, (Hamburg, GER)
Microtom	Leica JUNG RM2055, (Solms, GER)
Scanner	Nikon LS-5000 ED, (Zürich, CH)
Open- Field- Box	Eigenbau
Film Kamera	Logitech QuickCam Communicate MP, (Morges, CH)
Zentrifuge	5415 R, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf, GER)
Thermomixer	Comfort 1,5ml, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf, GER)
Western Blotting Kammer	Biometra, (Göttingen, GER)
Netzgerät	Power Pack 25, Biometra, (Göttingen, GER)

Roll-Mixer	Stuart Roller-SRT9, (Shaffordshire, UK)
ELISA-Reader	VersaMax Elisa Microplate Reader, Molecular Devices, (Sunnyvale, USA)
Gewebeaufschluss	TissueLyser LT, Quiagen, (Hilden GER)
Gewebeinfiltrationsautomat	Leica ASP 200 S, (Solms, GER)
Reinstwasser	Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach,GER)
Sputter Anlage	SL 9496, Balzers Union, (Lichtenstein, GER)
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop, Leo 1455VPSE, (Oberkochen, GER)
TEM	Transmissions- Elektronen-Mikroskop, Zeiss EM 902A, (Oberkochen, GER)
Von-Frey-Filamente	EB-Instruments, (ST Petersburg, USA)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Filterpapier	Whatman International Ltd., (Maidstone, UK)
PVDF Transfer-Membran	Millipore, Billerica, (Massachusetts, USA)
Röntgenfilm	Fuji Medical X-Ray Film, (Düsseldorf, GER)
Reagenzröhrchen	Falcon-Röhrchen, Ratiolab, (Dreieich, GER)
Pipetten	Eppendorf Pipetten Ratiolab, (Dreieich, GER)
Insulinspritzen	BD Micro fine, (Heidelberg, GER)

3.1.3 Chemikalien

- DAKO Envision system, DAKO für Kaninchen und Maus (Hamburg,

GER)

- Bouin`s solution, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- Eosin, Merck (Darmstadt, GER)
- Hematoxylin, Merck (Darmstadt, GER)
- Methanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Normal goat serum, KPL (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Roticlear, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tris, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- NaCl, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- HCl, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- TEMED, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Paraformaldehyd 8%, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Phosphorwolframsäure, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Phosphormolybdänsäure, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Titrisplex 3 R ,Merck, (Darmstadt, GER)
- Ethanol, Merck, (Darmstadt, GER)
- Methanol, Merck, (Darmstadt, GER)
- Milchpulver, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Tween 20, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, (Buckinghamshire, UK)
- Caerulein, Sulfated, Synthetic, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- Roti®-Mount, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)

Lösungen:

Zusammensetzung:

RIPA für 200 ml	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl, 1mM Na ₂ EDTA 1% NP-40 1% sodium deoxycholate
6x LSB für 200 ml	35 ml Tris HCl (1M9 pH6,8 10,28 g SDS 36,2 ml Glycerol 12 mg Bromphenolblau 10 ml β-2-Mercapto

4x Upper Tris	1,5 M (=60,8g) Tris 0,4 % (=4 g) SDS ad 1 l H ₂ O Check pH 6,8
4x Lower Tris	1,5 M (=181,65 g) Tris 0,4 % (= 4 g) SDS ad 1 l H ₂ O Check pH 8,8
10 % Ammonium persulfate	100 mg Ammonium persulfate 1 ml H ₂ O
SDS Laufpuffer (10x)	Tris 30,3 g fc: 250 mM Glycin 144g fc: 1,99M SDS 10g fc: 1% ad 1 l H ₂ O
Anodenpuffer I	Tris 36,3 g fc: 0,3 M Methanol 200 ml fc: 20% ad 1 l H ₂ O
Anodenpuffer II	Tris 3,03g fc: 0,025M Methanol 200 ml fc: 20% ad 1 l H ₂ O
Kathodenpuffer	Tris 3,03g fc: 0,025 M ε-Amino-capronsäure 5,24g fc: 0,04M Methanol 200 ml fc: 20%
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Natriumchlorid 137mM Kaliumchlorid 2,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat 10,14 mM Kaliumhydrogenphosphat 1,8 mM
I-Milch (in PBS)	Milchpulver 5 % Tween 20 0,1 %
II-Milch (in PBS)	Milchpulver 7,5 % Tween 20 0,1 %
PBS/Tween (in PBS)	Tween 20 0,1 %
4 % Sammelgel (10ml)	Bidest 6,2 ml 4 x UT 2,5 ml AA/BIS 1,35 ml TEMED 20 µl 10 % APS 30 µl

7,5 % SDS Polyacrylamidgel (40 ml)	Bidest 19,6 ml 4 x LT 10 ml AA/BIS 10 ml TEMED 40 µl 10 % APS 450 µl
EDTA-Lösung	Titrisplex 100g Tris 33g ad 1 l Bidest
Paraformaldehyd 4%	Paraformaldehyd 8% 50ml PBS 50ml
Richardson-Lösung	(1%)Azur II-Lösung 25% (1%)Methylenblau 25% Borax-Lösung 50%
Cacodylat-Puffer	Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat 8,56 g Aqua dest. ad 200 ml HCl (0,1 M) damit auf ph 7,2 - 7,4 einstellen
Bouin's Lösung	Pikrinsäure 1500 ml 37 %iges Formalin 500 ml Eisessig 100 ml
Phosphorwolframsäure/Phosphormolybdänsäure-Lösung	Phosphorwolframsäure 300ml Phosphormolybdänsäure 300ml Bides 600ml

3.1.4 Antikörper

- α -SMA, monoklonale Antikörper aus der Maus gegen Humanes Glattmuskelactin, clone1A4, REF M0851, Lot 00041467 , Dako
- HRP, Labelled Polymer, anti-Maus Antikörper, Dako
- P-ERK, P-p44/42 MAPK (T202/Y204) (D13.14.4 E) xP™ Kaninchen mAb, Lot 7, #4370 S, Cell Signaling Technology
- HRP, Labelled Polymer, anti-Kaninchen Antikörper, Dako
- GAPDH (6C5), monoklonaler Maus IgG, SC-32233, Lot #A1110, Santa Cruz Biotechnologie
- rCX3CR1 IgG Kaninchen Antikörper, Cat:TP501, Lot:030903, Acris Antibodies Torrey Pines Biolabs Inc.

3.1.5 Versuchstiere

- C57/B6/J Mäuse von Charles River GmbH, (Sulzfeld, GER)
- C57/B6/J CX3CR1^{-/-} knock-out Mäuse (Strain B6.129P-Cx3cr1^{tm1Litt}/J;

Stock 005582) von JAX® Mice and Services, (Bar Harbor, Maine, USA)

3.1.6 Software

Office 2010 (Word, Excel)	Microsoft
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
ImageJ	National Institutes of Health
Imaging software	Olympus analySIS software und Zeiss KS300 Program
EM- Software	Image SP, SYS-PROG

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimenteller Teil

3.2.1.1 Versuchstiere

Der Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern unter der Tierversuchsnummer: 55.2-1-54-2531-04-10 genehmigt. Im Versuch wurden männliche 8-9 Wochen alte C57/B6/J Mäuse mit einem Gewicht von 20 bis 25 Gramm als Kontrollen verwendet. 8-9 Wochen alte C57/B6/J CX3CR1-/- knock-out Mäuse mit einem Gewicht von 20 bis 25 Gramm stellten das Untersuchungskollektiv dar. Die Versuchstiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Rechts der Isar (Zentrum für Präklinische Forschung, ZPF) bei einem 12 stündigen Tag/Nachtrhythmus bei 24 °C gehalten. Alle Tiere hatten ständigen Zugang zu Futter (autoklaviertes Mäusefutter Fa. Altromin) und Wasser (autoklaviertes Trinkwasser bei zweimaligem Flaschenwechsel pro Woche). Die Mäuse wurden in Kleingruppen, drei oder vier Tiere pro Käfig (Grundfläche 16 x 37 cm), untergebracht. Die Haltung erfolgte in speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Mäusen (Tecniplast-IVC).

3.2.1.2 Caerulein induziertes Pankreatitismodell

Die Zufuhr hoher Dosen des Cholezystokinin(CCK)-Analoges Caerulein, führt im Tiermodell zu einer maximalen Überstimulierung des exokrinen Pankreas und damit zu einer akuten Pankreatitis (Lampel and Kern, 1977, Niederau et al., 1985, Renner et al., 1983, Lerch MM, 1994). Durch exzessive neuronale Stimulation kommt es zu Sekretionsschädigung des exokrinen Pankreas mit Anstieg der Pankreasenzyme im Serum und Vakuolenbildung in den Azinuszellen. Eine supramaximale Caeruleindosis führt innerhalb kürzester Zeit (Minuten bis Stunden) zu einer vollständigen Blockade der Exozytose der Zymogengranula an der luminalen Azinuszellmembran (Krukemeyer M G 2005, Georg Thieme Verlag, Saluja et al., 1989). Auslöser dieser Blockade ist die Aktivierung des CCK-Rezeptors verbunden mit einer ausgeprägte Fusion intrazellulärer Membranen und Ausbildung intrazellulärer Vakuolen (Scheele et al., 1987, Adler et al., 1979). Im weiteren Verlauf der Caerulein induzierten Pankreatitis kommt es zu fokalen Pankreasnekrosen. Durch repetitive Applikationen von Caerulein über einen längeren Zeitraum wird eine chronische Pankreatitis induziert (Adler et al., 1979, Lampel and Kern, 1977). Weder bei der Maus noch bei der Ratte werden in diesem Untersuchungsmodell Hämorrhagien oder Letalitäten erzeugt. Die repetitive intraperitoneale Applikation des Caeruleins hat sich gegenüber der intravenösen Gabe weitgehend durchgesetzt (Krukemeyer M G 2005, Georg Thieme Verlag). Die intraperitoneale Injektion von Caerulein führt bei Mäusen zu einer schweren akuten Pankreatitis. Der Schweregrad der Erkrankung ist höher als bei der Ratte. Auch bei Hamstern und Hunden führt die supramaximale Stimulation durch Caerulein zu einer akuten Pankreatitis (Niederau et al., 1985, Renner et al., 1983, Lerch MM, 1994).

3.2.1.3 Induktion der akuten und chronischen Pankreatitis

AKUTE PANKREATITIS

Nach initialer Messung des nociceptiven Schmerzverhaltens (Von-Frey-Filamenten) und Allgemeinverhalten (Open-Field-Test), wurde die akute Pankreatitis durch intraperitoneale Injektionen von 50µg Caerulein/kg/Injektion in 100µl physiologischer Kochsalzlösung, durch 10 malige Injektionen in

stündlichen Intervallen, ausgelöst.

Die Versuchstiere des Versuchsansatzes zur **akuten Pankreatitis** waren in 5 Gruppen aufgeteilt:

1. **WT** (Wildtyp) *C57/B6/J* Mäuse: Diese Gruppe bestand aus 17 Mäusen, bei denen durch 10 repetitive Caerulein Injektionen eine akute Pankreatitis ausgelöst wurde.
2. **cWT** (Kontrolle Wildtyp) *C57/B6/J* Mäuse: Bei diese Gruppe von 6 Tieren wurde durch 10 repetitive Injektionen von physiologischer Kochsalzlösung keine Pankreatitis erzeugt. Diese Gruppe diene als Kontrollgruppe (*sham treatment*).
3. **KO** (knock-out) *C57/B6/J* Mäuse $CX3CR1^{-/-}$: Die dritte Gruppe beinhaltete ebenfalls 17 Mäuse. Diese transgenen Tiere besitzen keinen Fractalkin Rezeptor. Alle Tiere dieser Gruppe wurden vor Versuchsbeginn durch Schwanzbiopate auf Abwesenheit des Rezeptors $CX3CR1$ getestet. Auch bei dieser Gruppe wurden durch 10 repetitive Caerulein Injektionen eine akute Pankreatitis induziert.
4. **cKO** (Kontrolle knock-out) *C57/B6/J* Mäuse $CX3CR1^{-/-}$: Diese Kontrollgruppe beinhaltete wiederum 6 Mäuse. Hierbei wurde durch 10 repetitive Injektionen von physiologischer Kochsalzlösung keine Pankreatitis ausgelöst. Durch diese Kontrollgruppe der transgenen Tiere sollten eventuelle Unterschiede in der Schmerzäußerung und Verhaltensbiologie sowie in der Histologie und den molekularbiologischen Untersuchungen zu den nicht transgenen Kontrolltieren ausgeschlossen werden.
5. **AK** (mit Antikörpern gegen $CX3CR1$ behandelt) *C57/B6/J* Mäuse: 12 Mäuse bekamen ebenfalls 10 Caerulein Injektionen, um eine akute Pankreatitis hervorzurufen. Allerdings wurde eine Stunde nach der ersten Caerulein Injektion 25µg $CX3CR1$ blockierender Antikörper in therapeutischer Absicht intraperitoneal appliziert.

Im Versuch wurden 6 *C57/B6/J* Mäuse und 6 *C57/B6/J CX3CR1^{-/-}* knock-out Mäuse als Negativkontrollen mitgeführt. Diesen Tieren wurde 100µl physiologische Kochsalzlösung ohne Caerulein injiziert (*sham-treatment*). Bei allen Mäusen wurde nach der siebten Injektion (nach 6 Stunden) die Schmerzmessung und der Open-Field-Test wiederholt. Nach 12 Stunden und einer

finalen Schmerzmessung und Open-Field-Testung, wurden die Tiere durch Exsanguination in Narkose getötet (Abb.7). Alle Mäuse wurden direkt vor dem Versuchsbeginn und nach den letzten Verhaltensmessungen gewogen.

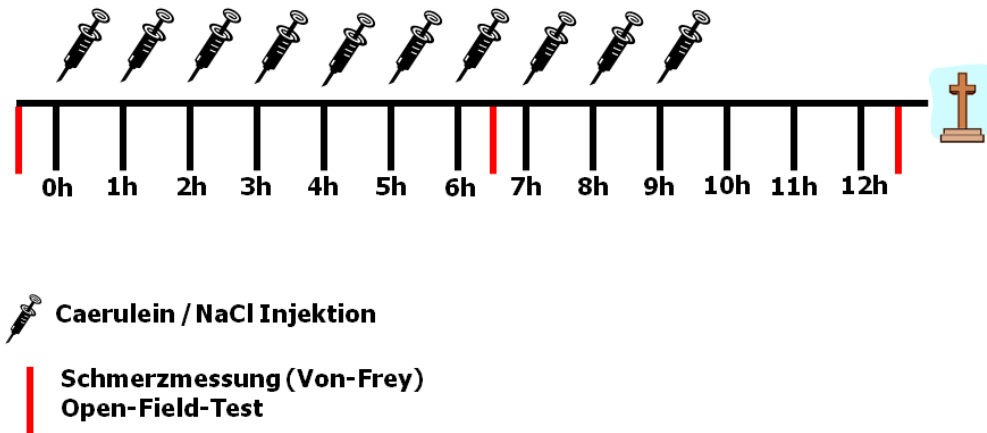


Abbildung 7: Zeittafel; Schematische Darstellung des akuten Pankreatitis Versuchsablaufes.

CHRONISCHE PANKREATITIS

Die **chronische Pankreatitis** wurde durch intraperitoneale Injektionen von 50µg Caerulein/kg/Injektion in 100µl physiologischer Kochsalzlösung, als 5 repetitive Injektionen in stündlichen Intervallen, jeden zweiten Tag, über einen Zeitraum von 8 Wochen, induziert. Die Versuchstiere des Versuchsansatzes zur chronischen Pankreatitis können analog zum akuten Pankreatitis Versuch in 4 Gruppen (**WT**, **cWT**, **KO**, **cKO**) aufgeteilt werden. Als Kontrollen wurden jeweils 6 (*C57/B6/J* und *CX3CR1^{-/-}*) Mäuse mit physiologischer Kochsalzlösung untersucht. Allen Tieren wurde ein Volumen von 100µl injiziert. Nach einer initialen Schmerz- und Open-Field-Messung am Morgen des ersten Tages, bekamen die Tiere am Nachmittag des ersten Versuchstages 5 Caerulein/NaCl Injektionen in stündlichen Abständen. Der Schmerz- und Open-Field-Versuch wurde alle 7 Tage wiederholt (Abb.8). Das Körpergewicht der Tiere wurde alle 2 Tage (jeweils vor den Injektionen) bestimmt.

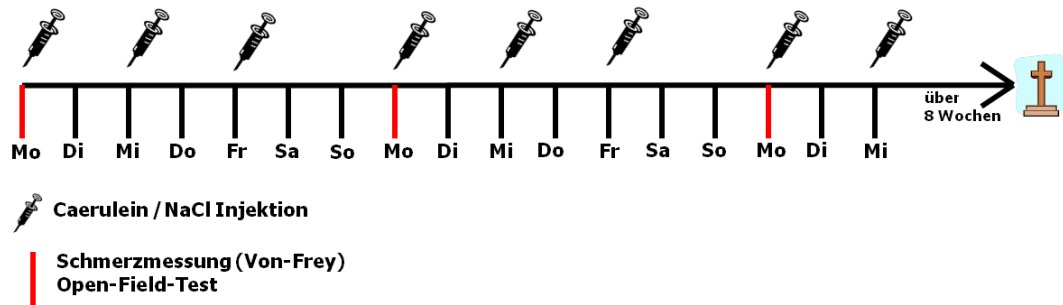


Abbildung 8: Zeittafel; Schematische Darstellung des Versuchsablaufes für die chronische Pankreatitis.

3.2.1.4 Open-Field-Test

Der Open-Field-Test ist eine weit verbreitete, standardisierte Versuchsmethode zur quantitativen Darstellung der verhaltensbiologischen Beobachtungen bei Mäusen (Archer, 1973, Walsh and Cummins, 1976). Viele Parameter wie Lokomotion, Freiaufrichten oder Putzzeiten lassen sich gut dokumentieren. In dieser Versuchsreihe zur akuten Pankreatitis sollte mit Hilfe des Open-Field-Tests die schmerzrelevanten Verhaltensweisen dokumentiert werden. Dadurch sollten Rückschlüsse auf den nicht evozierten Ruheschmerz (Spontanschmerz) im Gegensatz zum durch Stimulation erzeugten Belastungsschmerz möglich sein (Houghton et al., 2001). Hierbei wurde eine aus weißem Plexiglas, 50 x 50cm breite und 30cm hohe, Open-Field-Box angefertigt (Abb.9). Die Tiere im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis wurden nach einer 5 minütigen Eingewöhnungszeit in dieser Box über einen Zeitraum von 8 Minuten mit einer CCD-Kamera gefilmt und die Laufstrecke mit Hilfe des Computerprogramm Image J zentimetergenau ermittelt (Abb.10). Im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis wurden die Tiere 5 Minuten gefilmt. Die physiologische Erregung eines Tieres zeigt sich in dem Absetzen von Kot und Urin (Flint et al., 1995) und dem Reinigen des eigenen Fells (Choleris et al., 2001). Die Verhaltensweise Aufrichten des Oberkörpers und auf den Hinterbeinen sitzen (*Rearing*), wird allgemein als explorative Eigenschaft gewertet. Die Verhaltensweisen (Freiaufrichten „*Rearing*“, Putzen, Sprünge, Kratzen, bauchwärts Blicken, Defäkation, Urinieren) wurden anhand des Videos ausgezählt.

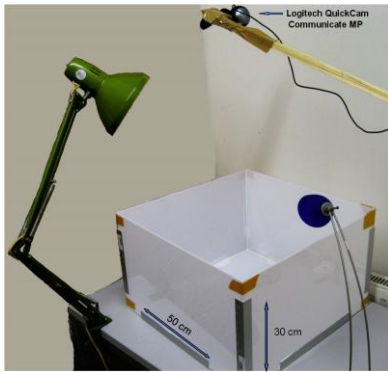


Abbildung 9: Open-Field-Box. Während des Versuchs wurde die Open-Field-Box von zwei Seiten ausgeleuchtet und die Mäuse mit einer CCD-Kamera gefilmt.

Auswertung der Laufstrecke

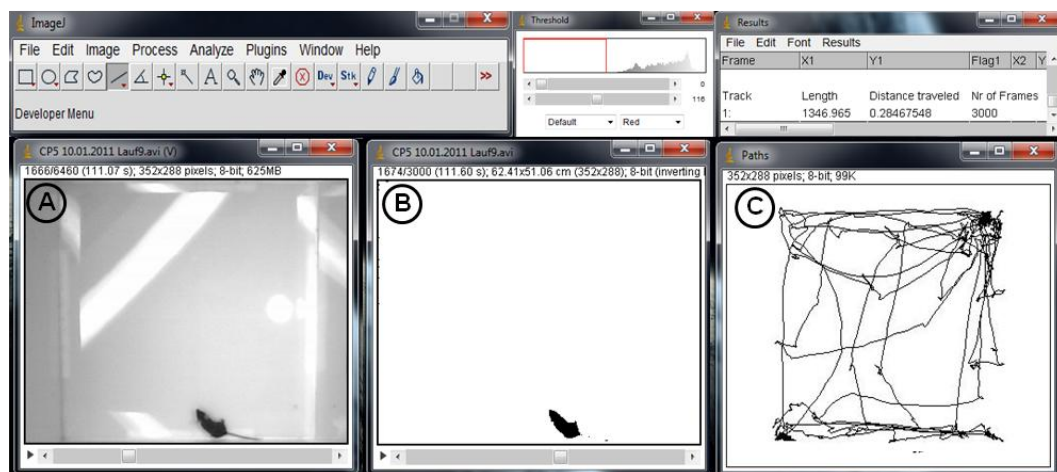


Abbildung 10: Beispiel der computerunterstützten Auswertung der Laufstrecke. Bild (A) zeigt das Originalvideo. (B) Bis auf das Farbprodukt wurde der Hintergrund herausgefiltert, so dass nur noch die Maus sichtbar war. Anschließend konnte die Laufstrecke bildlich dargestellt (C) und die Länge berechnet werden.

3.2.1.5 Evoziertes Schmerzverhalten (Von-Frey-Filamente)

Der Belastungsschmerz wurde durch ein punktförmigen Stimulus mit Hilfe von kalibrierten Von-Frey-Filamenten hervorgerufen und diente zur Testung mechanischer Hyperalgesie (Frey, 1896, Verlag S. Hirzel). Es ist bekannt, dass eine intensive Verletzung intestinaler Organe zu einer Sensibilisierung von Haut und Muskulatur führt (Laird et al., 2001). Bei den verwendeten Filamenten handelt es sich um dünne, synthetische Fasern, mit denen ein definierter Druck auf das Abdomen ausgeübt werden kann. Dieser ist erreicht, wenn sich die Faser durchbiegt und bleibt auch bei weiterem Durchbiegen konstant. Im Versuch wurden Von-Frey-Filamente unterschiedlicher mechanischer Kraft (1,65; 2,36; 2,44; 2,83; 3,22; 3,61; 3,84 mN) auf das Abdomen aufgesetzt und

Verhaltensweisen dokumentiert. Pro Filament wurde jeweils 10 mal im Abstand von ca. 5 Sekunden die schmerzassoziierten Verhaltensweisen mit einem Punktesystem bewertet (Abb.11).

		Filamentkraft in mN																													
		0,00			1,65			2,36			2,44			2,83			3,22			3,61			3,84								
Messung	1	0			0			1			1			0			1			1											
	2	0			0			1			1			1			0			1											
	3	0			1			0			1			1			1			1											
	4	0			0			0			0			1			1			1											
	5	0			0			0			0			1			1														
	6	0			1			1			1			0			1														
	7	0			0			0			0			0			0			1											
	8	1			1			1			1			1			1			1											
	9	0			0			1			1			1			2														
	10	0			0			0			0			0			0			1											
Summe:		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
		1			3			5			6			6			8			12											

0=keine Reaktion,

1=schwache Reaktion: Aufstehen, Umschauen zum Abdomen, zusammenzucken

2=starke Reaktion: Sprünge, Ausschlagen mit den Hinterbeinen

Abbildung 11: Beispiel einer Auswertungstabelle durch den Von-Frey-Filament Test. Oben sind die acht verschiedenen Filamentkräfte aufgelistet. Die roten Zahlen stehen für die Reaktion der Maus auf die Filamente. Die grünen Zahlen bilden die Summe aller 10 Reaktionen pro Maus. Die durch Buchstaben gekennzeichneten Felder zeigen den Zeitpunkt der Messung an. Zum Beispiel bei dem akuten Pankreatitis Versuch: A= vor Caeruleingabe B= nach 6 Stunden C= nach 12 Stunden.

3.2.1.6 Gewinnung der Gewebeproben des Pankreas

Sowohl bei der chronischen Pankreatitis als auch bei der akuten Pankreatitis wurden die Mäuse am Ende des Versuchs mit Isofluran sediert und mit intraperitonealer Gabe von Ketamin (100mg/kg) /Xylazin (10mg/kg) narkotisiert. Nach einer Rasur des Abdomens, wurde durch eine halbe Zirkumzision der Bauchraum eröffnet. Durch das intakte Zwerchfell wurde das Herz zur möglichst vollständigen Blutentnahme punktiert, wodurch die Tiere letztlich an einer kontrollierten Hypovolämie starben. Danach wurde das Pankreasgewebe mit der Milz entnommen und in 6 etwa gleich große Teile aufgeteilt (Abb.12).

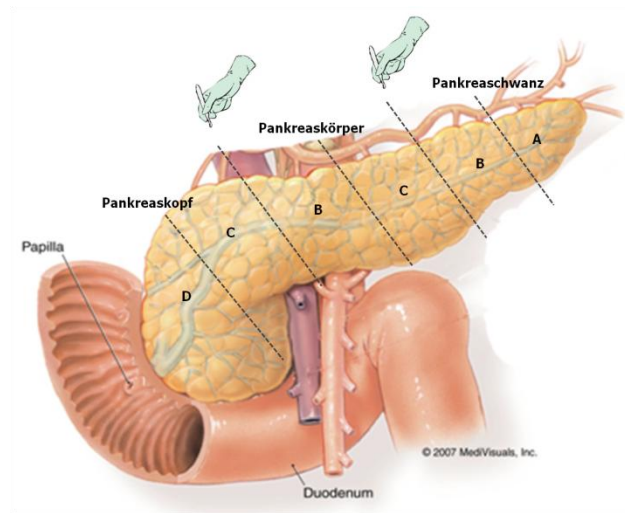


Abbildung 12: Darstellung der Verteilung der Proben. Durch Orientierung an der ebenfalls mit entnommenen Milz wurden nahezu die gleichen Gewebestücke verwendet. Das erste Stück (A) vom Pankreasschwanz wurde zur Ödembestimmung genommen. Ebenfalls vom Pankreasschwanz wurde ein Stecknadelkopf großes Stück für die EM genommen. Jeweils ein Stück aus Pankreasschwanz (B) und Körper (B) für HE und IHC verwendet. Je ein Stück aus Pankreaskörper (C) und Kopf (C) wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und das letzte Stück (D) für Cryoschnitte des Pankreaskopfes in Tissue-Teck konserviert (modifiziert von MediVisuals, Inc.)

Außerdem wurden bei den Mäusen des Versuchsansatzes zur chronischen Pankreatitis die Thorakalwirbel Th8 bis Th11 unter einem Stereomikroskop entnommen. Hierbei wurden die Wirbelkörper entfernt und das Rückenmarkstück für Western Blot Analysen schockgefroren, und zur histologischen Untersuchung aufgearbeitet.

3.2.3 Histologische und molekularbiologische Untersuchungen

3.2.3.1 Histologische Aufarbeitung der Gewebeproben

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden Gewebestücke aus dem Pankreaskopf und Pankreaskörper verwendet. Direkt nach der Organentnahme wurden die Stücke 24h in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert, über 24h in 70% Ethanol ausgewaschen und im Gewebeeinfiltrationsautomat durch eine aufsteigende Alkohol-Reihe entwässert und paraffiniert. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet und am Rotationsmikrotom etwa 3µm dick geschnitten. Danach wurden die Proben ca. 24 Stunden im Wärmeschränk getrocknet. Die fertigen Paraffinschnitte wurden in Roticlear entparaffinisiert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert und mit Hämatoxylin/Eosin, Anilin gefärbt oder für Immunhistochemische Färbung weiterverarbeitet.

3.2.3.2 CX3CR1 knock-out

Vor Versuchsbeginn wurde bei allen knock-out Mäusen an Schwanzbiopsien die völlige Abwesenheit des Fractalkin-Rezeptors nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte nach Angaben des Lieferanten der knock-out-Mäuse „The Jackson Laboratory“ JAX® Mice and Services, (Bar Harbor, Maine, USA), (www.jax.org).

Aus dem Gewebe wurde mit Standardmethoden (DNA-easy nach Angaben des Herstellers) die DNA isoliert. Durch Real-Time PCR nach Standardprotokoll (Sambrook J., 1989) mit den Primern *wild type* oIMR3945 (5`-TTC ACG TTC GGT CTG GTG GG 3`), *Common* oIMR3946 (5`-GGT TCC TAG TGG AGC TAG GG-3`), *Mutant* oIMR3947 (5`-GAT CAC TCT CGG CAT GGA CG-3`) der Firma „The Jackson Laboratory“ JAX® Mice and Services, (Bar Harbor, Maine, USA), (www.jax.org) wurde im Gegensatz zu den Wildtypmäusen kein PCR-Produkt erhalten.

Protocol Primers				
Primer	5' Label	Sequence 5' --> 3'	3' Label	Primer Type
oIMR3945	-	TTC ACG TTC GGT CTG GTG GG	-	Wild type
oIMR3946	-	GGT TCC TAG TGG AGC TAG GG	-	Common
oIMR3947	-	GAT CAC TCT CGG CAT GGA CG	-	Mutant

3.2.3.3 Spormann-score

Scoring-Systeme sind in der experimentellen Pankreatologie etabliert. Der am häufigsten angewandte Score zur morphologischen Klassifizierung des Pankreatitis-Schweregrades wurde 1989 von Spormann et al. beschrieben.

Von jedem Versuchstier wurden 2 Objektträger mit Schnitten von jeweils 2 unterschiedlichen Pankreasbereichen mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Um den Schweregrad der Pankreatitis zu ermitteln, wurde der Schweregrad des Ödems, sowie das Vorhandensein von inflammatorischen Infiltraten, Nekrosen und Hämorrhagien einzeln bewertet (Tabelle 1). Die Gesamtsumme der einzelnen Parameter ergibt den sogenannten Spormann-score und dient als Maß für den Schweregrad der Pankreatitis. Der Spormann-score wurde durch zwei unabhängige Untersucher am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Heidelberg unter der Leitung von Dr. Frank Bergmann ermittelt.

Parameter:	Score:	Kriterium:
Ödem	0	fehlend
	1	fokal
	2	intermediär
	3	massiv
Inflammatorisches Infiltrat	0	fehlend
	1	perivaskulär
	2	an den Läppchengrenzen
	3	plaqueartig
Nekrose	0	fehlend
	1	fokal
	2	intermediär (gesamtes Pankreas betroffen, einzelne Herde nicht konfluierend)
	3	massiv (konfluierende Herde im gesamten Pankreas)
Hämorrhagie	0	fehlend
	1	fokal
	2	Intermediär (gesamtes Pankreas betroffen, einzelne Herde nicht konfluierend)
	3	massiv (konfluierende Herde im gesamten Pankreas)

Tabelle 1: Spormann-Score zur Beurteilung des morphologischen Schweregrades der Pankreatitis

3.2.3.4 Bestimmung des Ödems im Pankreasgewebe

Hierzu wurde ein Stück vom Pankreasschwanz direkt nach der Organentnahme gewogen und anschließend für 12h bei 99°C im Trockenschrank getrocknet. Der Gewichtsverlust im Trockenschrank wurde prozentual umgerechnet und als Gewebeödem gewertet (Klinzing et al., 2000, Gao et al., 2005).

3.2.3.5 Bestimmung der intrapankreatischen Vakuolisierung

Caerulein blockt die luminale Sekretion von Pankreasenzymen und führt zur Akkumulation von Zymogengranula mit Vakuolenbildung (Saluja et al., 1989). Die Vakuolen können morphologisch intakt erscheinen oder zerstörte Zymogengranula und andere geschädigte Zellkompartimente enthalten. Es wird vermutet, dass die Bildung dieser Vakuolen eine wichtige pathophysiologische

Bedeutung auch bei der menschlichen Erkrankung hat (Krukemeyer M G 2005, Georg Thieme Verlag).

Für die Bestimmung des Vakuolisierungsgrads und somit den Schweregrad der akuten Pankreatitis wurden vier Gesichtsfelder aus den HE-Schnitten pro Tier für die Bestimmung der Vakuolenzahl genutzt. Diese Untersuchung wurde nur bei den Mäusen mit einer akuten Pankreatitis durchgeführt. Hierfür wurden alle sichtbaren Vakuolen ausgezählt und addiert.

3.2.3.6 Serum α -Amylase und Lipase Werte

Bei der Organentnahme wurde durch Herzpunktion das gesamte Blutvolumen entnommen. Nach ca. einer halben Stunde wurde das Vollblut 10 Minuten bei 3600 U/min zentrifugiert, und das Serum gewonnen. Die Bestimmung der α -Amylase und Lipase Aktivität wurde in dem universitätsinternen Institut für Hämatologie vorgenommen.

3.2.3.7 Anilin Färbung des Bindegewebes

Die in Kapitel 2.2.3.1 beschriebenen fertigen Gewebeschnitte wurden bei 56°C eine Stunde lang in Bouin's Lösung fixiert und anschließend 15 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte in Phosphorwolframsäure/Phosphormolybdänsäure-Lösung 5 Minuten inkubiert und anschließend mit Anilin-blau gefärbt. Nachdem die Schnitte ca. 2 Minuten in 1% Essigsäure inkubiert und danach unter deionisiertem Wasser abgespült worden sind, wurden die fertig gefärbten Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Roticlear fixiert. Als letzter Schritt erfolgte die Eindeckelung durch eine Polyacrylat-Lösung (Roti®-Mount).

3.2.3.8 Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA

Der Immunhistochemische Nachweis von Glattmuskel- α -Actin (α -SMA) wurde durchgeführt, um den Schweregrad der pankreatischen Fibrogenese zu quantifizieren. α -SMA ist ein Marker für die aktivierten pankreatischen

Sternzellen, die eine zentrale Rolle bei der pankreatischen Fibrogenese einnehmen.

Die deparaffinierten Schnitte wurden nach einigen Waschschritten mit destilliertem Wasser und TBST (Tris-buffered-saline mit Tween20) in Citrat-Puffer 10 Minuten bei 600W in der Mikrowelle erhitzt. Danach folgten weitere Waschschriffe in TBST und 0,5% Triton X100 mit anschließendem blocken der Proben mit 3% Hydrogenperoxid zur Unterdrückung der endogenen Peroxidase. Nach einem letzten Waschschriff in destilliertem Wasser wurden die Objektträger mit 10% Normal-goat-serum für eine Stunde geblockt und danach über Nacht mit dem erst-Antikörper α -SMA (1:1000 verdünnt in Abdecklösung), anschließend eine Stunde mit dem zweit-Antikörper Meerretichperoxidase (HRP-Anti-mouse) inkubiert. Als letzter Schriff wurde mit Diaminobenzidin (DAB) die immunchemische Reaktion visualisiert. Auf eine HE-Gegenfärbung wurde bewusst verzichtet, um die computergestützte Auswertung zu erleichtern. Die fertigen Präparate wurden durch einen Nikon Slide Scanner eingescannt und mittels der Computersoftware Image J quantitativ ausgewertet (Abb.13). Dazu wurde ein repräsentativer Gewebebereich markiert und die Fläche berechnet (als 100%). Danach wurde bei dem Bild bis auf das „Farbprodukt“ der Hintergrund herausgefiltert, so dass nur noch die immunoreaktiven Bereiche sichtbar waren. Als letztes wurde diese immunoreaktive Fläche vermessen und ebenfalls auf % der Gesamtfläche umgerechnet (Abb.13).

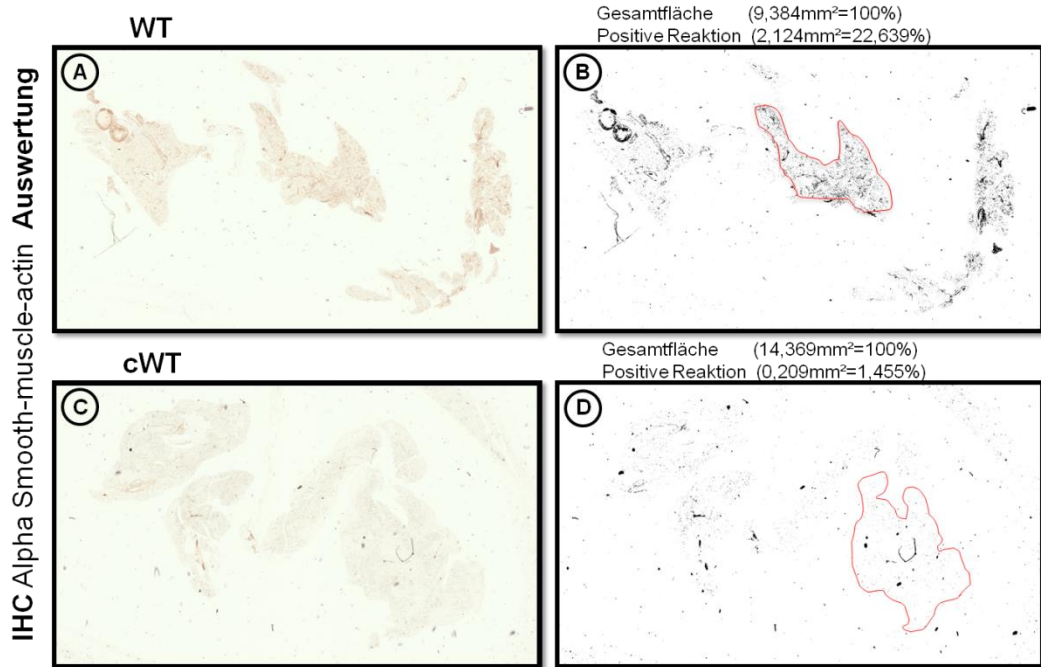


Abbildung 13: Beispiel der computerunterstützten Auswertung mittels Image J: A=kompletter Scan von der α -SMA IHC von einer Maus mit manifestierter chronischer Pankreatitis; B=Das gleiche Bild A durch Image J nur noch immunreaktiver Bereich sichtbar. Die Gesamtfläche des von Hand markierten repräsentativen Gewebebereiches beträgt hierbei 9,384mm² (100%) und die immunreaktive Fläche ist 2,124mm² (22,639%); C=Objektträger Scan einer Kontrollmaus; D=Das gleiche Bild C. Die Gesamtfläche des von Hand markierten repräsentativen Gewebebereiches ist 14,369mm² (100%). Der Immunreaktive Bereich ist 0,209mm² (1,455%)

3.2.3.9 Immunhistochemie p-ERK

Im Zusammenhang mit der zentralen Schmerzweiterleitung lässt sich die damit einhergehende erhöhte neuronale Aktivität der sensorischen Fasern im dorsalen Hinterhorn durch ein vermehrtes Auftreten von Phosphor-ERK nachweisen (Ji et al., 1999, Gao and Ji, 2009).

Die Proben des Rückenmarks zusammen mit den Wirbelkörpern wurden 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Proben zum Entkalkifizieren 48 Stunden in EDTA-Lösung eingelegt. Die IHC gegen p-ERK erfolgte nach dem gleichen Standardprotokoll wie die bereits oben beschriebene IHC gegen α -SMA. Der erst-Antikörper p-ERK wurde 1:200 in Abdecklösung verdünnt. Die Auswertung erfolgte in ähnlicher Weise wie die bereits oben beschriebene Methode zur Auswertung der IHC mit α -SMA (Erkan et al., 2008). Die Schmerzweiterleitung beginnt mit dem ersten synaptischen Reiz und wird im Hinterhorn (Lamina I, II und V) sortiert und über ein zweites Neuron zu höher gelegenen Schmerzzentren im Gehirn weitergeleitet. Deshalb wurde nur

der Bereich des Hinterhorns ausgewertet (Abb.14).

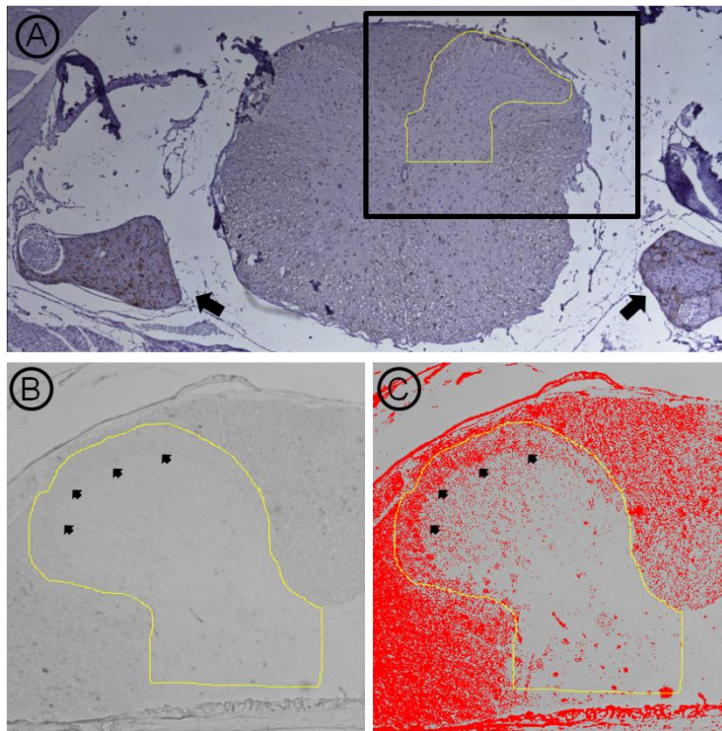


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der Auswertung mittels Image J des Hinterhorns im Rückenmark: A= Querschnitt eines Rückenmarks. Links und rechts vom Rückenmark sind die pfeilmarkierten Spinalganglien zu erkennen. Der schwarzmarkierte Bereich zeigt in etwa den vergrößerten Bereich des Rückenmarks in B und C. Der gelb umrandete Bereich markiert das ganze Hinterhorn; B= Bild eines Hinterhorns von einer Maus mit erhöhter neuronaler Aktivität. Die Pfeile zeigen den dorsalen Kranz mit verstärkter Immunoreaktivität. B= Für den markierten Bereich kann anschließend, wie bereits für α -SMA beschrieben, die Immunoreaktivität computergestützt quantitativ ausgewertet werden.

3.2.3.10 Western Blot p-ERK

Zur Analyse wurde der Thorakalwirbel-Bereich des Rückenmarks (Th8-Th11) entnommen, von den Wirbelkörpern freipräpariert und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Rückenmarkproben wurden mit einem TissueLyser LT homogenisiert und der Gesamtproteingehalt photometrisch durch einen Elisa Microplate Reader bestimmt. Die Proben (jeweils 30 μ g) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (Laemmli, 1970). Die Membran mit dem erst-Antikörper p-ERK (1:2000) in 5ml Milch-Abdecklösung wurde über Nacht inkubiert. Nach mehreren Wasch- und Blockschritten und 45 minütiger Inkubation mit dem HRP markierten zweit-Antikörper, wurde die Membran mit ECL-Lösung nach Angaben des Herstellers behandelt. Die durch enzymatische Umsetzung der HRP verursachte Chemilumineszenz führt zu einer Schwärzung eines Röntgenfilms. Um relative

Mengen von p-ERK in den Proben besser vergleichen zu können, wurde GAPDH als Ladungskontrolle ebenfalls nachgewiesen.

3.2.3.11 Elektronen Mikroskopische Untersuchung

Bei der Organentnahme wurden ca. Stecknadelkopf-große Pankreaskopfgewebeprobe in 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Diese Proben wurden in Kooperation mit dem Institut für Zellbiologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf für die Elektronen Mikroskopische (EM) Untersuchung aufbereitet.

Für die Transmissions Elektronen Mikroskopische (TEM)-Untersuchung wurden die Gewebeprobe nach Reynolds in 0,1M Cacodylat-Puffer überführt und nach einigen Tagen in 2% Osmium tetroxide (O_8O_4) für 2 Stunden fixiert und kontrastiert. Nachdem die Proben durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe entwässert und in Propylenoxid überführt wurden, konnte sie in Araldit gegossen und anschließend mit dem Ultramikrotom geschnitten werden. Die fertigen Ultra-Dünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert (Reynolds, 1963). Die Semidünnschnitte wurden mit der Richardson-Lösung (Azur II/Methylenblau) gefärbt.

Für die Raster Elektronen Mikroskopische (REM)-Untersuchung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff überführt und mit einer Rasierklinge gebrochen. Danach erfolgte die sogenannte Kritische-Punkt-Trocknung „*critical-Point-drying*“ durch CO_2 in der Sputter Anlage. Anschließend wurden die Proben mit Gold besputtert und unter dem REM angeschaut.

3.3 Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM (Standard Error of the Mean) berechnet und unter Gebrauch des sogenannten „t-test“ evaluiert. Zum Vergleich nicht-parametrischer Werte zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Die Graphiken der Schmerzmessungen durch die Von-Frey-Filamente wurde mit der sogenannten „area under the curve analyse“ analysiert und anschließend mittels T-test statistisch ausgewertet. Für alle verwendeten statistischen Auswertungen gilt $p < 0,05$ als Signifikanz-Niveau, wobei $p < 0,05$

als signifikanter und $p < 0,01$ als hoch signifikanter Unterschied angesehen wird.

4 Ergebnisse

Die Versuchstiere des Versuchsansatzes zur *akuten Pankreatitis* wurden in 5 Gruppen aufgeteilt. Zum einen in die Versuchsgruppen KO, WT, AK und zum anderen in die Kontrollgruppen cKO, cWT (s. Abb. 15). Die Tiere des Versuchsansatzes zur *chronischen Pankreatitis* wurden in 4 Gruppen aufgeteilt, zwei Versuchsgruppen (KO, WT) und zwei Kontrollgruppen (cKO, cWT). Bei allen transgenen Tieren wurden vor Versuchsbeginn die tatsächliche Abwesenheit des Rezeptors CX3CR1 durch Schwanzbioptate bestätigt.

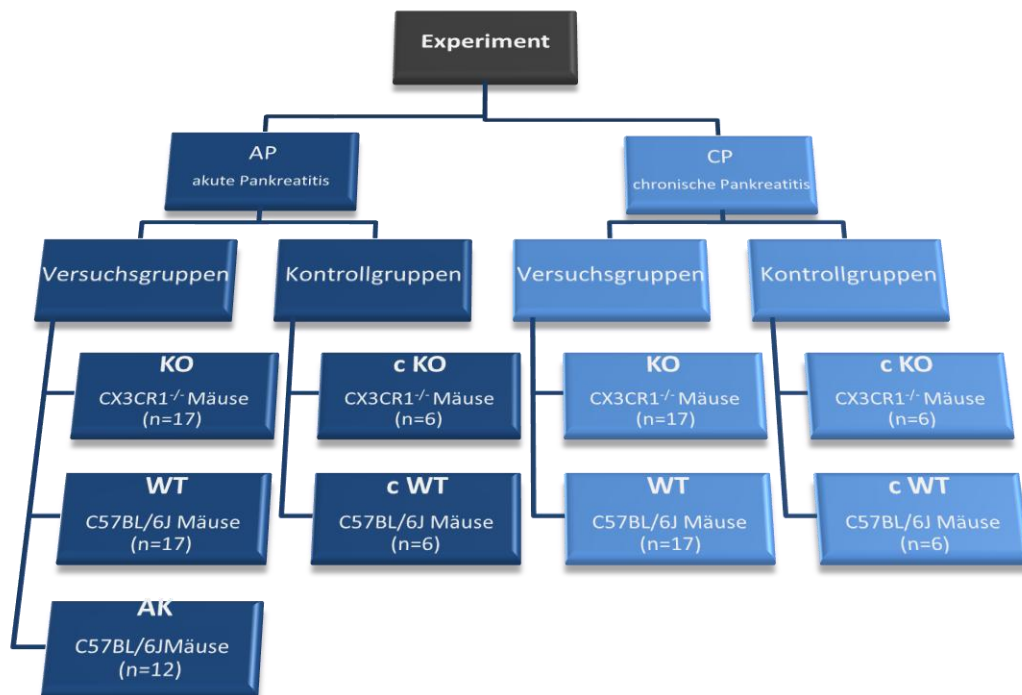


Abbildung 15: Übersicht der Versuchs- und Kontrollgruppen für beide Versuchsarme

4.1 Strukturelle Analyse der pathologischen Veränderungen bei experimentell induzierter akuter und chronischer Pankreatitis

4.1.1 Makroskopische Veränderungen

Bereits beim Eröffnen der Bauchhöhle konnten makroskopisch sichtbare

Veränderungen der Pankreata festgestellt werden. Bei den Tieren mit akuter Pankreatitis war das Pankreas durch eine spezifische pankreatische Ödembildung deutlich vergrößert. Das chronisch veränderte Organ hingegen war dagegen viel kompakter und stark atrophiert (Abb.16).

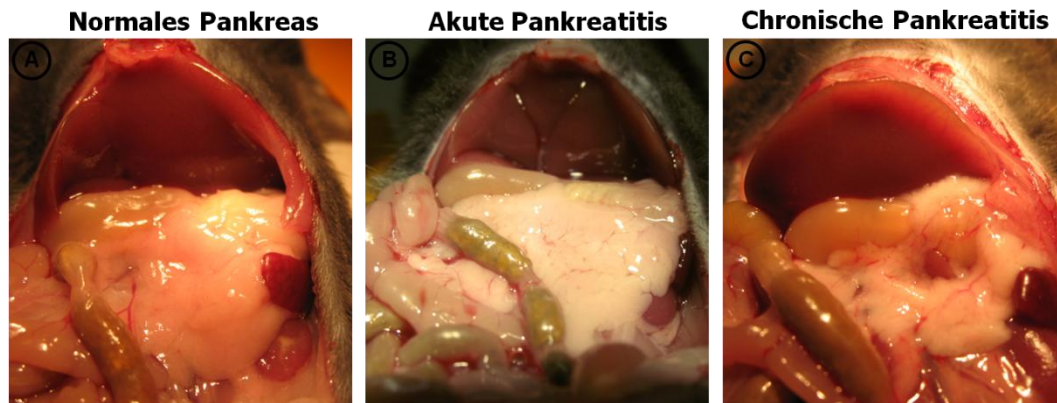


Abbildung 16: Vergleichende morphologische Darstellung vom normalem Pankreas (A), akuter Pankreatitis (B) und chronischer Pankreatitis (C). Bei der akuten Pankreatitis (B) war ein pathologisches Ödem zu beobachten, das das Organ glasig und insgesamt vergrößert erscheinen lässt. Des Weiteren zeigt sich eine lockere, gelappte Struktur mit bereits makroskopisch sichtbarem interlobulärem Ödem. Bei der chronischen Pankreatitis (C) war das gesamte Organ deutlich atrophiert und verhärtet.

4.1.2 Histopathomorphologische Veränderungen

Durch die mit HE-gefärbten histologischen Präparate und die Methylenblau-gefärbten Semidünnschnitte konnten die für eine akute Pankreatitis typischen pathologischen Veränderungen beobachtet werden (Abb.17,18). Diese sind vor allem durch das Auftreten eines interstitiellen Ödems, Entzündungszellinfiltration und zum Teil nekrotische Areale gekennzeichnet. Das histologische Bild der chronischen Pankreatitis war durch ein deutlich fibrotischen Parenchymbau, eine massive Infiltration von Entzündungszellen, und die Bildung von sogenannten tubulären Komplexen charakterisiert (Abb.19,20). Bei der morphologischen Betrachtung des gesamten Pankreas konnte weder bei der akuten noch bei der chronischen Pankreatitis einen Unterschied zwischen WT- und KO-Tieren beobachtet werden. Auch die HE-gefärbten histologischen Schnitte zeigten keinen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen. Die quantitative Auswertung erfolgte durch den Spormann-score, der in Kapitel 4.4 näher beschrieben wird.

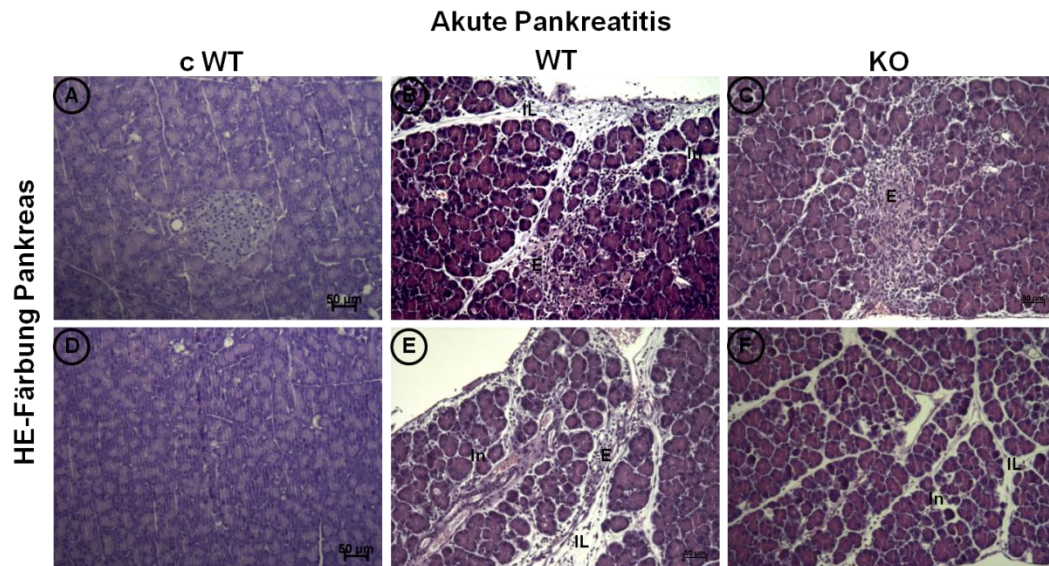


Abbildung 17: Versuchsansatz zur **akuten Pankreatitis**: Lichtmikroskopische Beispielbilder der cWT- (A, D), WT- (B, E) und KO- (C, F) Gruppe. Das normale Pankreas der WT-Kontrollgruppe (A, D) zeigte eine kompakte Gewebestruktur. Die histologischen Schnittbilder des Pankreas der Versuchsgruppen (KO, WT) zeigten ödematös verbreiterte Interzellulärräume interazinär sowie die makroskopisch bereits erkennbaren erweiterten Interlobulärräume mit Entzündungszellinfiltration. In Bild (B) und (C) ist eine massive Entzündungszell-Invasion zu erkennen. E=Entzündungszellen, IL=Interlobulärräume, In= Interzellulärräume

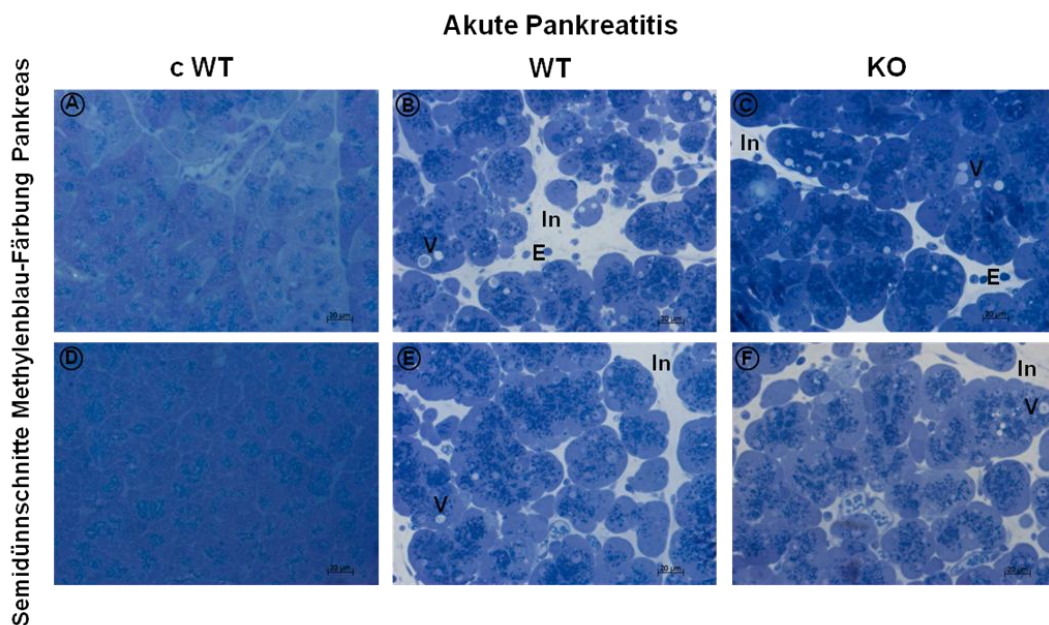


Abbildung 18: Versuchsansatz zur **akuten Pankreatitis**: Beispielbilder von Semidünnschnitten der cWT- (A, D), WT- (B, E) und KO- (C, F) Gruppe. Die Schnitte der WT- und KO- Gruppe (B, E, C, F) zeigten die gleichen pathologischen Veränderungen, deutlich sichtbares interazinäres Ödem mit Entzündungszellen und intraazinäre Vakuolen. E=Entzündungszellen, In= Interzellulärräume, V=Vakuolen

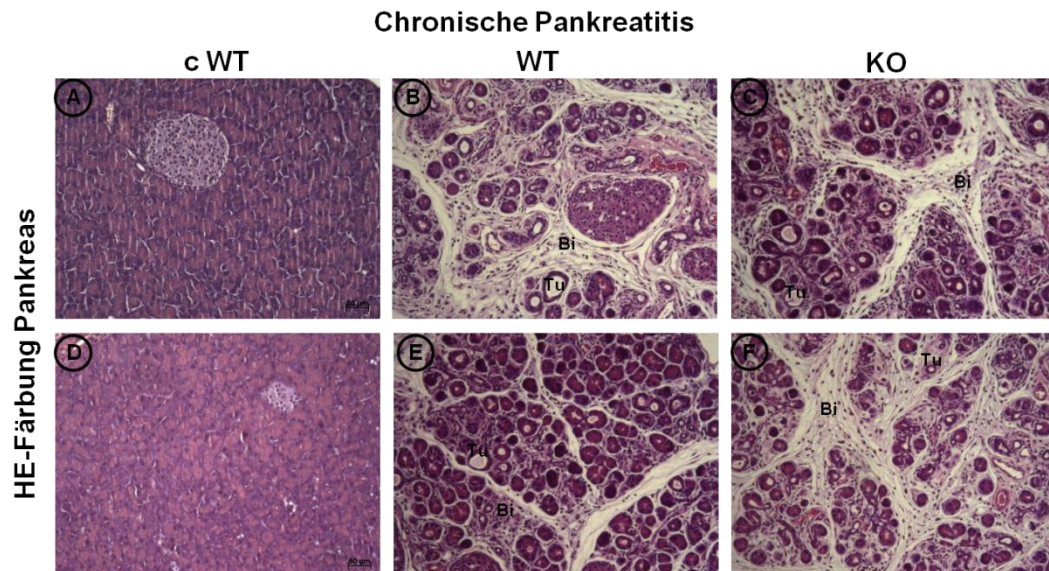


Abbildung 19: Versuchsansatz zur **chronischen Pankreatitis**: Lichtmikroskopische Beispielbilder der cWT- (A, D), WT- (B, E) und KO- (C, F) Gruppe. Das normale Pankreas (A, D) war durch seine kompakte leicht eckige Azinusstruktur charakterisiert. Die chronisch veränderten Pankreata (B, E, C, F) waren durch krankhaft vergrößerten Bindegewebsanteil mit Entzündungszellen und für eine chronische Pankreatitis typischen Tubulären Komplexen gekennzeichnet. Bi=Bindegewebe, Tu=Tubuläre Komplexe

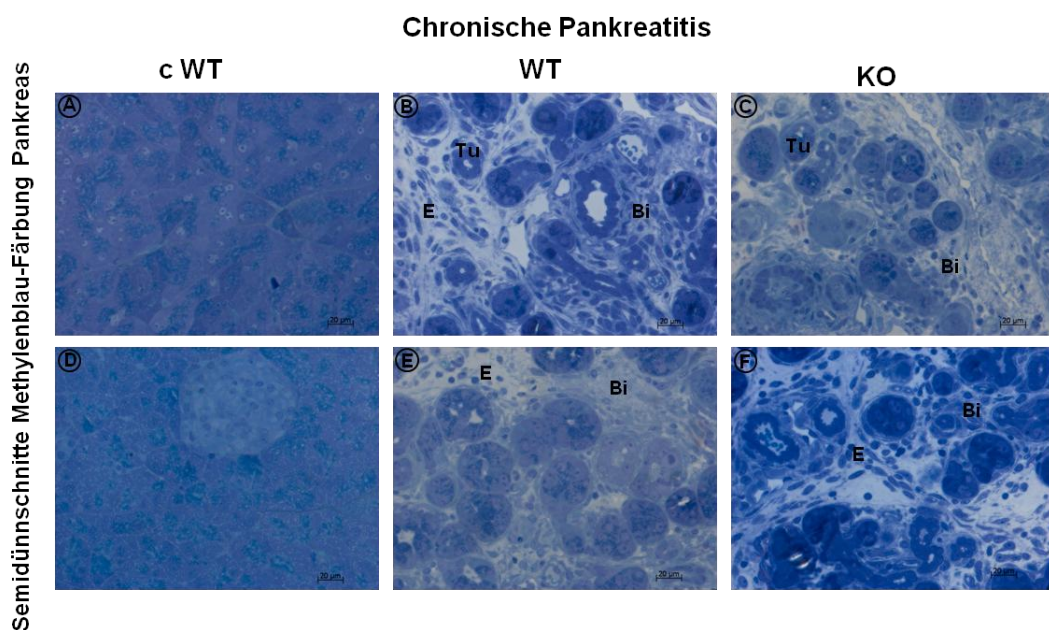


Abbildung 20: Versuchsansatz zur **chronischen Pankreatitis**: Beispielbilder von Semidünnschnitten der cWT- (A, D), WT- (B, E) und KO- (C, F) Gruppe. Die Schnitte der WT- und KO- Gruppe (B, E, C, F) zeigten die gleichen pathologischen Veränderungen, vergrößerter Bindegewebsanteil mit Entzündungszellen und Tubulären Komplexen. E=Entzündungszellen, Bi=Bindegewebe, Tu=Tubuläre Komplexe

4.1.2.1 Intrapankreatische Vakuolisierung

Bei der Caerulein induzierten Pankreatitis wird die luminale Sekretion von Pankreasenzymen verhindert und dadurch kommt es zur Akkumulation von Zymogengranula mit Vakuolenbildung.

Die Auszählung der intrapankreatischen Vakuolen wurde bei allen Versuchstieren des akuten-Pankreatitis-Arms durchgeführt. Um eventuelle Auswirkungen des CX3CR1^{-/-} knock-out auf die Ausbildung azinärer Vakuolen zu dokumentieren wurden die Vakuolen anhand von HE-Schnitten ausgezählt. Bei den mit Caerulein behandelten Tieren konnten eindeutig Vakuolen unterschiedlichster Größe identifiziert werden (Abb.22). Für die quantitative Darstellung wurde die Summe der Anzahl an azinären Vakuolen in vier Bildausschnitten pro Maus ausgezählt. Der Vergleich von den Tieren der WT-Gruppe (23.88 ± 1.22), KO-Gruppe (25.41 ± 1.13) und der AK-Gruppe (22.75 ± 3.05) zeigte hierbei keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Vakuolen (Abb.23). Bei den Kontrolltieren cWT (2.00 ± 0.44) und cKO (3.00 ± 0.89) waren nahezu keine Vakuolen zu beobachten (Abb.22,Abb.23).

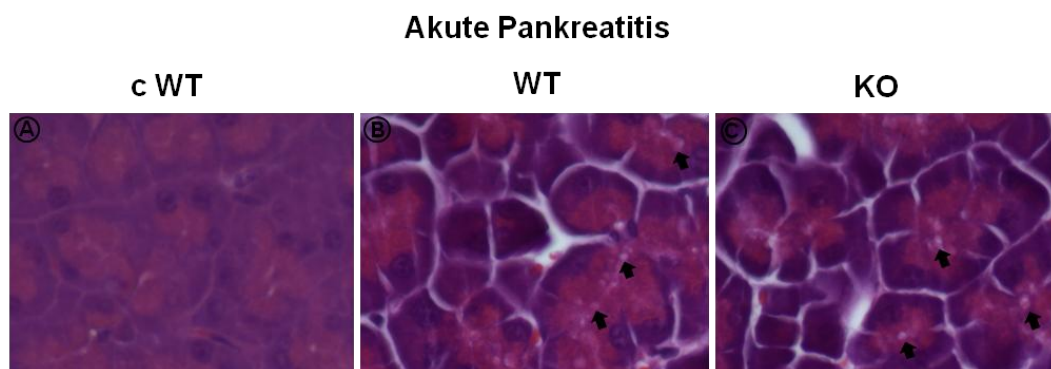


Abbildung 21: Beispielbilder der intrapankreatischen Vakuolen. Bei der cWT- Kontrollgruppe (A) waren keine Vakuolen zu beobachten. Die Versuchgruppen (WT, KO) zeigten in gleicher Weise intrapankreatischen Vakuolisierungen (Pfeile in B + C).

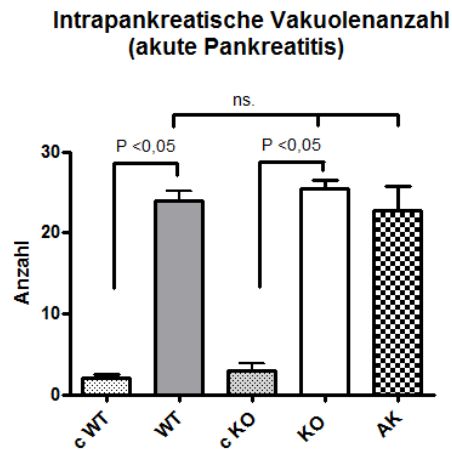


Abbildung 22: Graphische Darstellung der intrapancreatischen Vakuolenanzahl. Die WT-Gruppe mit einer Anzahl von 23.88 ± 1.22 unterschied sich nicht wesentlich von der KO- (25.41 ± 1.13) und der AK-Gruppe (22.75 ± 3.05). Bei den Kontrollgruppen cWT (2.00 ± 0.44) und cKO (3.00 ± 0.89) waren nahezu keine Vakuolen zu beobachten.

4.1.2.2 Fibrotische Aktivität in der chronischen Pankreatitis

Bei histologischen Schnitten der Pankreata von Tieren des Versuchsansatzes zur chronischen Pankreatitis wurde der krankhaft vermehrte Bindegewebsanteil mittels Anilinfärbung markiert und analysiert. Die Kontrolltiere (cWT, cKO) zeigten nur wenig angefärbte Bereiche. Bei den Versuchstieren (WT, KO) konnten Bereiche mit vermehrtem Bindegewebe beobachtet werden (Abb.21). Ein Unterschied des Bindegewebsanteils konnte zwischen KO- und WT- Tieren nicht festgestellt werden.

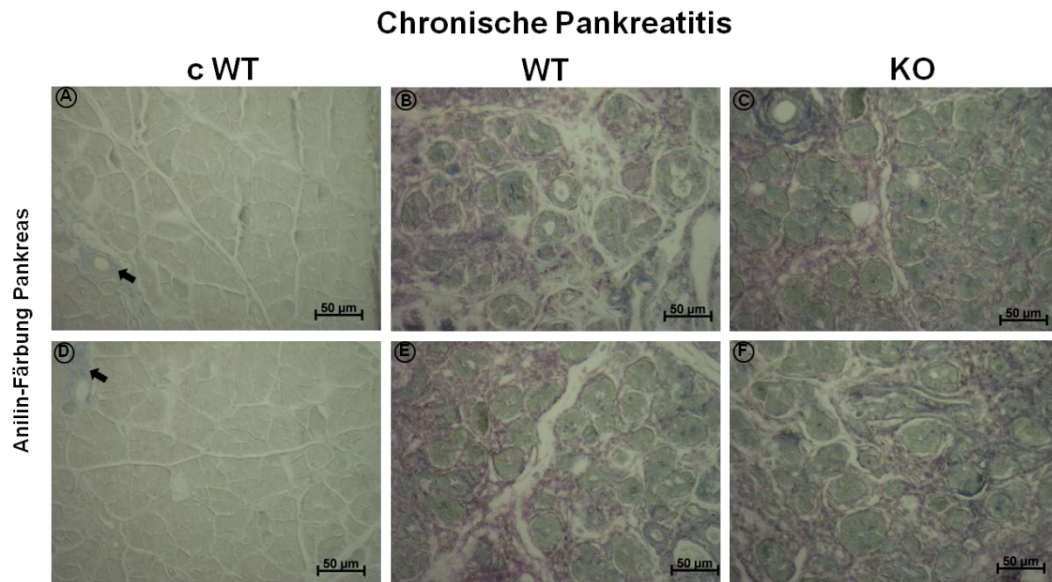


Abbildung 23: Beispielbilder von anilingefärbten Schnitten der cWT- (A), WT- (B) und KO- (C) Gruppe aus dem Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis. Die Schnitte der WT- und KO-Gruppe (B, E, C, F) zeigten etwa gleich große Bindegewebsanteile. Bei den Kontrolltieren färbten sich nur die pfeilmarkierten Gefäße an (A, D).

4.1.2.3 α -SMA Fibroblasten Aktivierung

Der immunhistochemische Nachweis von Glattmuskel α -Actin (*α -smooth-muscle-actin*, α -SMA) wird als Marker eines fibrotischen Umbaus des Pankreasgewebe genutzt. In dem chronischen-Pankreatitis-Arm konnten hoch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen beobachtet werden. Während bei den Kontrollgruppen sich nur die glatte Muskulatur der Gefäße anfärbte, sind die Versuchsgruppen durch deutlich sichtbare periarzinäre Akkumulation von Fibrozyten, Fibroblasten und anderen α -SMA exprimierenden Zellen gekennzeichnet (Abb.24). Die computerunterstützte quantitative Auswertung ergab weiterhin eine signifikant ($p < 0.01$) erhöhte Zahl α -SMA positiver Zellen der KO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe (Abb.25).

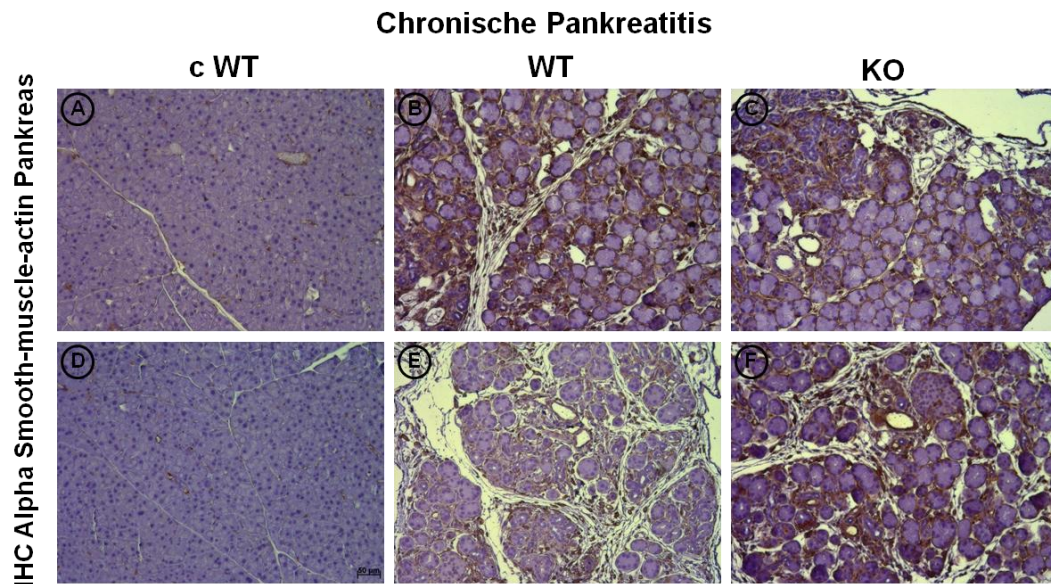


Abbildung 24: Beispielbilder der IHC gegen α -smooth-muscle-actin. Die Versuchgruppen WT und KO zeigten deutlich sichtbare periarzinar gefärbte Bereiche (B, E, C, F). Die Kontrollgruppe zeigte lediglich gefärbte glatte Muskulatur der Gefäße (A, D).

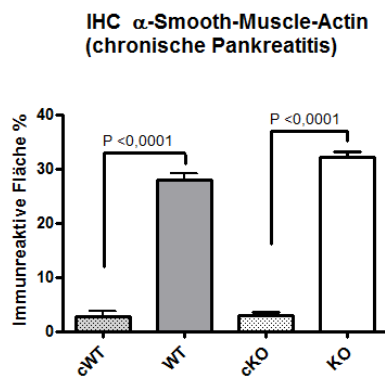


Abbildung 25: Quantitative Darstellung der immunohistochemischen Analyse von α -smooth-muscle-actin. Die Versuchsgruppen zeigten eine hoch signifikant erhöhte immunoreaktivität gegenüber den Kontrollgruppen. Interessanterweise zeigten die KO-Mäuse gegenüber den WT-Tieren eine erhöhte Zahl α -SMA positiver Zellen. Die Auswertung der Schnitte erfolgte wie in Kapitel 3.2.3.8 beschrieben.

4.1.3 Elektronenmikroskopische Analyse der Ultrastruktur

Die elektronenmikroskopische Analyse wurde durchgeführt, um eventuelle Unterschiede in der Pathomorphologie zwischen KO- und WT-Mäusen zu untersuchen. Es wurden sowohl Proben von Pankreata aus dem akuter Pankreatitis- als auch Proben von dem chronischer Pankreatitis-Arm untersucht.

Die Ultradünnschnitte von Mäusen mit akuter Pankreatitis zeigten deutliche pathologische Veränderungen. Auffälligster Unterschied zum Normalpankreas war bei der akuten Pankreatitis das stark dilatierte raue endoplasmatische Retikulum in den Azinuszellen. Bei näherer Betrachtung der einzelnen Azinuszellkerne wurden häufige Formveränderungen beobachtet. Auch die Anzahl der noch intraazinär gelegenen Zymogengranula war vermindert. Im erweiterten Intrazellularraum konnten diverse Entzündungszellen identifiziert werden (Abb.26 B,C ; Abb.27 B,D). Bei den semi-quantitativen Auswertungen wurde der erweiterte Interzellularraum, die Entzündungszellinfiltration, die Strukturveränderungen des Zellkerns und dilatiertes Endoplasmatische Retikulum und Kollagen beurteilt. Unterschiede in der Pathomorphologie zwischen AP-KO- und AP-WT-Mäusen konnten hierbei nicht beobachtet werden (Tabelle 2).

Bei der Untersuchung der chronischen Pankreatitis konnten ebenfalls ausgeprägte pathologische Veränderungen beobachtet werden. Der beim Normalpankreas kompakte Zellverband hatte sich bei der chronischen Pankreatitis bereits weitgehend aufgelöst. Die für die chronische Pankreatitis typischen tubulären Komplexe und charakteristische autolytische Prozesse, wie die Bildung von Vesikularkörpern, die Anwesenheit diverse Zellfragmente und Zellkerne ohne Zellen, charakterisierten das Bild einer ausgeprägten chronischen Pankreatitis (Abb.26 E,F ;Abb.28 B,D).

Durch die Rasterelektronen Mikroskopie, konnte der räumliche Strukturaspekt in einem größeren Blickfang untersucht werden. Die Proben der akuten Pankreatitis waren durch deutlich verbreiterte Interazinärräume mit Entzündungszellinfiltraten gekennzeichnet (Abb.26 H,I; Abb.29 E,F; Abb.30). Bei den Proben der chronischen Pankreatitis wurden Azinuszellatrophien mit kompaktem periazinärem Bindegewebe und Entzündungszellen beobachtet (Abb.26 K,L; Abb.29 H,I; Abb.31)

Sowohl bei den Transmissions-Elektronen-Mikroskopischen als auch bei den Raster-Elektronen-Mikroskopischen Untersuchungen konnten keine sichtbaren pathomorphologischen Unterschiede zwischen den Tieren der KO-Gruppe und den Tieren der WT-Gruppe festgestellt werden (Tabelle 2; Tabelle 3).

TEM

	Erweiterter Interzellularraum	Kollagen	Entzündungs- zellinfiltration	Struktur- veränderung Zellkern	Dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum
NP-cWT	-	-	-	-	-
AP-WT	+++	-	+++	++	+++
AP-KO	+++	-	+++	++	+++
CP-WT	++	++	+ / ++	+++	-
CP-KO	++	++	+ / ++	+++	-

Tabelle 2: Semi-quantitative Analyse der Transmissions Elektronen Mikroskop Bilder. NP, normales Pankreas; AP, akuter Pankreatitis; CP, chronische Pankreatitis. Beurteilt wurde eine Fläche von 100x100 µm. – fehlend; + schwach; ++ mäßig; +++ stark

REM

	Interazinäres Ödem	Bindegewebe	Entzündungszellinfiltration
NP (cWT)	-	-	-
AP-WT	+++	-	+++
AP-KO	+++	-	+++
CP-WT	++	++	+ / ++
CP-KO	++	++	+ / ++

Tabelle 3: Semi-quantitative Analyse der Raster Elektronen Mikroskop Bilder. NP, normales Pankreas; AP, akuter Pankreatitis; CP, chronische Pankreatitis. Beurteilt wurde eine Fläche von 100x100 µm. – fehlend; + schwach; ++ mäßig; +++ stark

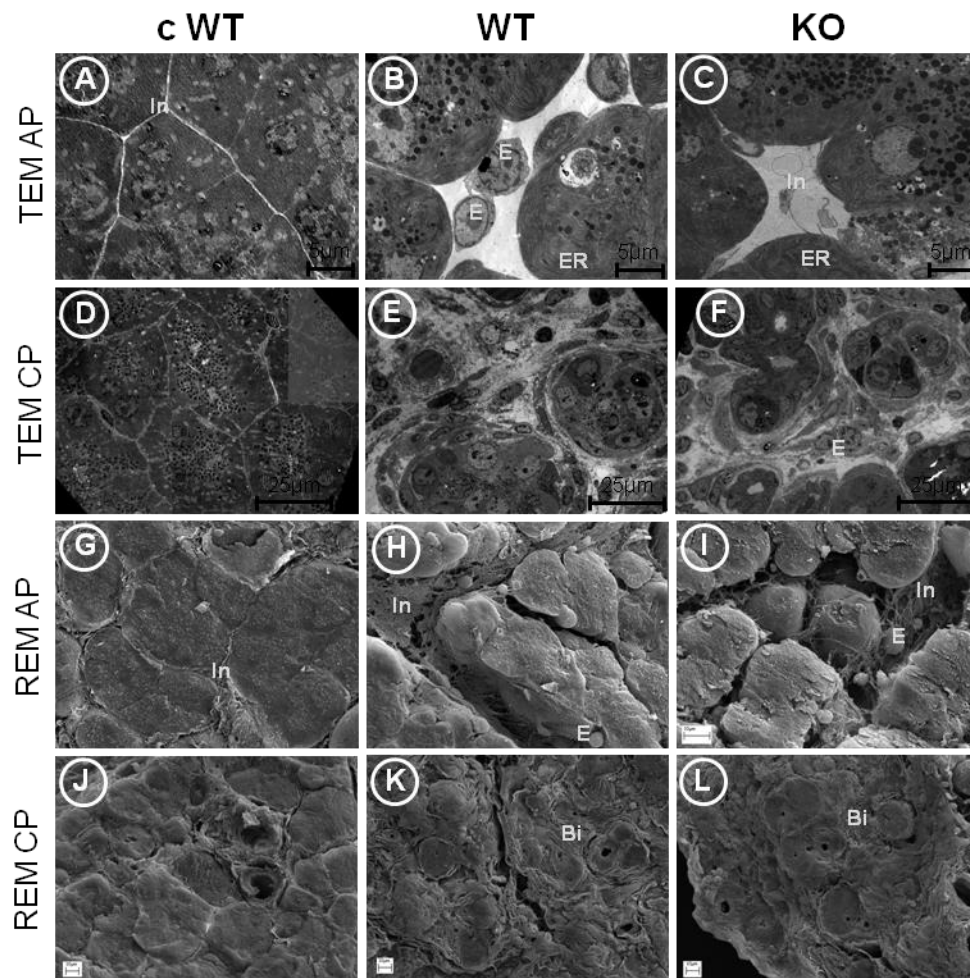


Abbildung 26: REM und TEM vergleichende Übersicht CP und AP. Die linke Spalte zeigt exemplarische Bilder eines normalen Pankreas (A, D, G, J). Die mittlere- und rechte Spalte zeigt Bilder von WT- bzw. KO-Tieren mit manifestierter akuter bzw. chronischer Pankreatitis. Bei den TEM AP Bildern (B, C) sind Entzündungszellen im verbreiterten Interzellularraum und intraazinär dilatiertes endoplasmatisches Retikulum zu sehen. Die CP Bilder (E, F) zeigen vermehrtes Bindegewebe mit stark abgerundeten Azinuskomplexe und vor allem periäzinärer Ansammlungen von Entzündungszellen. Die REM AP Bilder (H, I) zeigen zwischen den Azini deutlich verbreiterte Räume. Bei den Bildern (K, L) wird das vermehrt kompakte Bindegewebe der chronischen Pankreatiden deutlich sichtbar. E=Entzündungszelle, In=Interzellularraum, ER=endoplasmatisches Retikulum, Bi=Bindegewebe

Normales Pankreas

Akute Pankreatitis

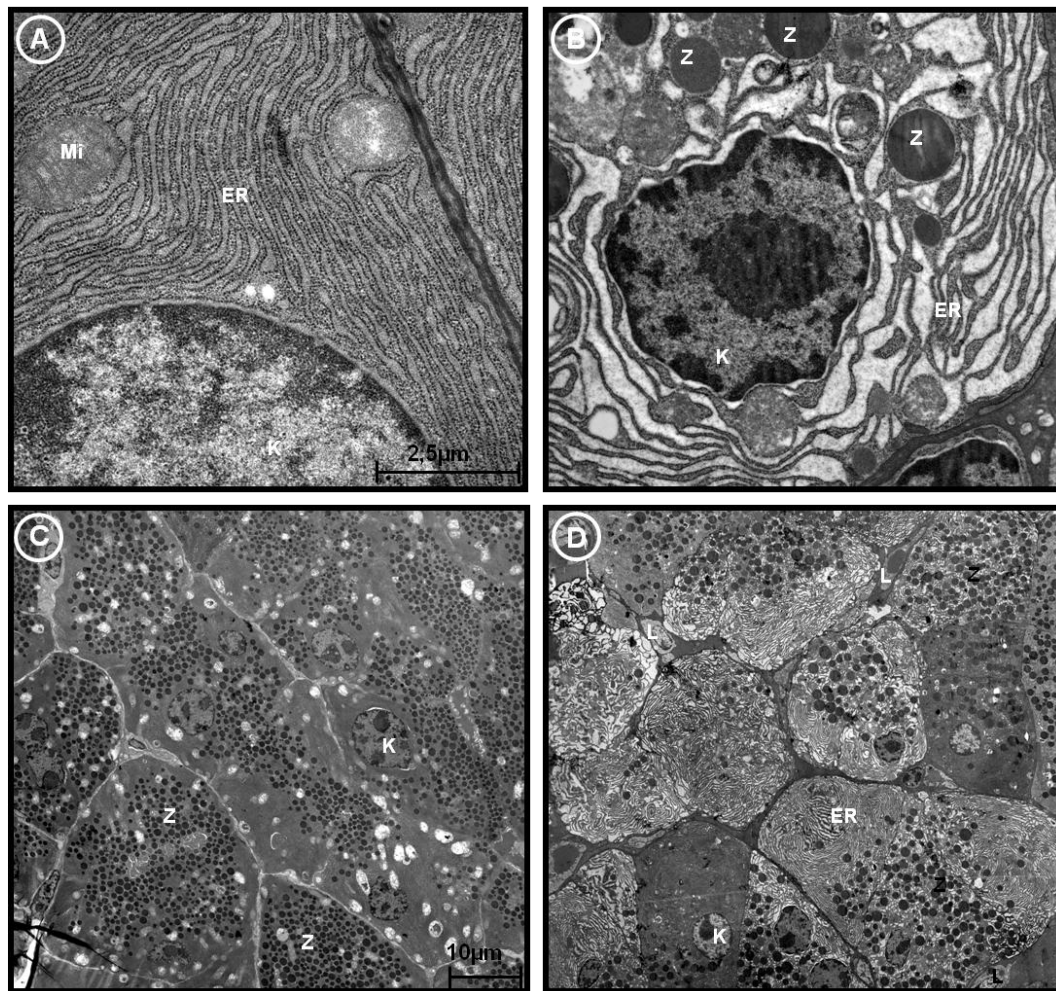


Abbildung 27: TEM Beispielbilder der akuten Pankreatitis. Bild (A) zeigt einen gesunden runden Zellkern umgeben von endoplasmatischem Retikulum. Das rechte Bild (B) zeigt den pathologisch veränderten Zellkern umgeben von stark dilatiertem endoplasmatischem Retikulum. Bild (C) Normales Pankreas ist durch Azinuszellen gefüllt mit Zymogengranula charakterisiert. In Bild (D) fällt das stark dilatierte endoplasmatische Retikulum und die teils unförmigen Zellkerne auf. Die Zellen enthalten viel weniger bis keine Zymogengranula mehr. Mi=Mitochondrien, L=Leukozyt, Z=Zymogengranula, K=Zellkern, ER=endoplasmatisches Retikulum,

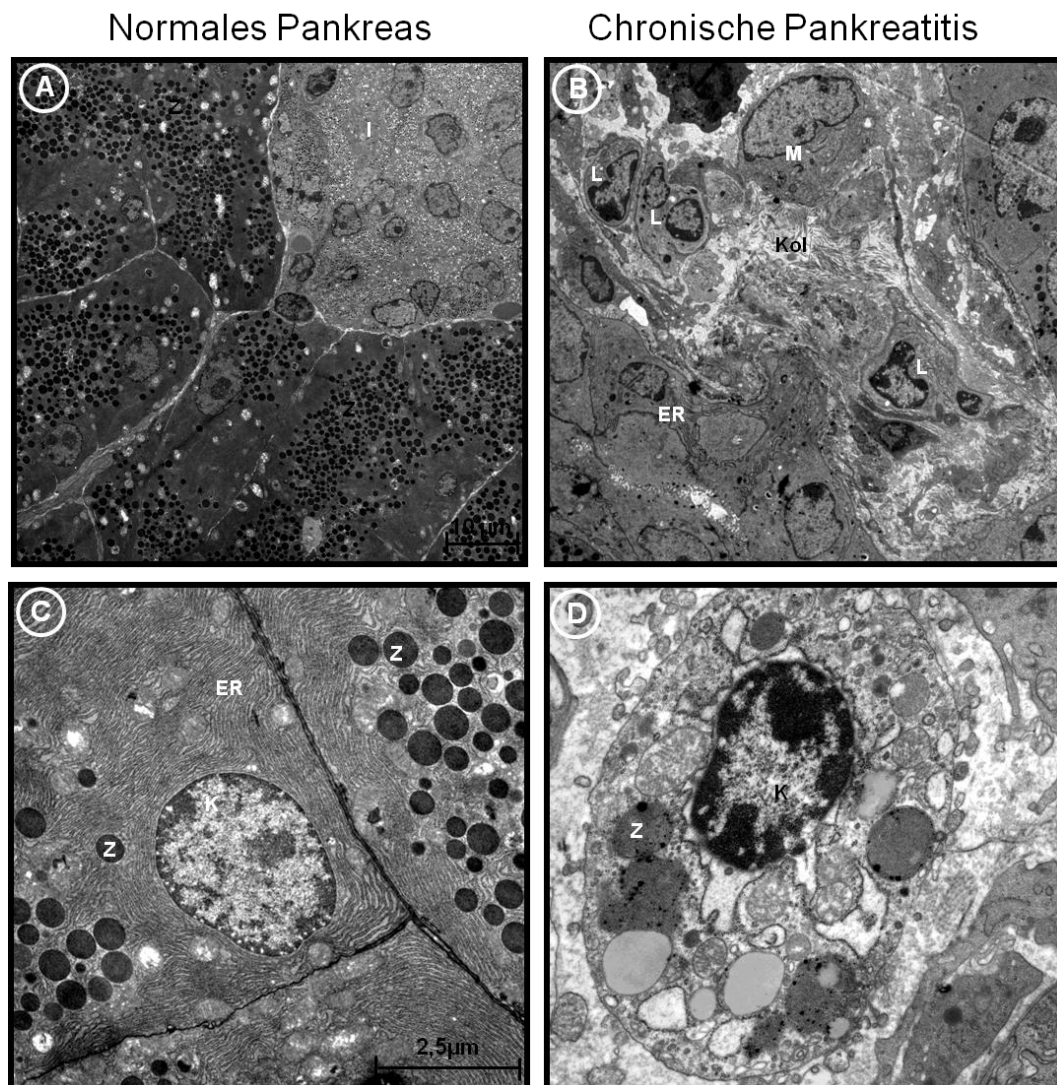


Abbildung 28: TEM Beispielbilder der chronischen Pankreatitis. (A,C) Normales Pankreas. (B) chronische Pankreatitis. Das Bild ist geprägt durch Entzündungszellen, Zellfragmente und Kollagen. Die ursprünglichen azinären Strukturen sind nicht mehr erkennbar. (D) Azinuszelle in Autolyse. L=Langerhans-Insel, M=Makrophage, Kol=Kollagen, L=Leukozyt, Z=Zymogengranula, K=Zellkern, ER=endoplasmatisches Retikulum,

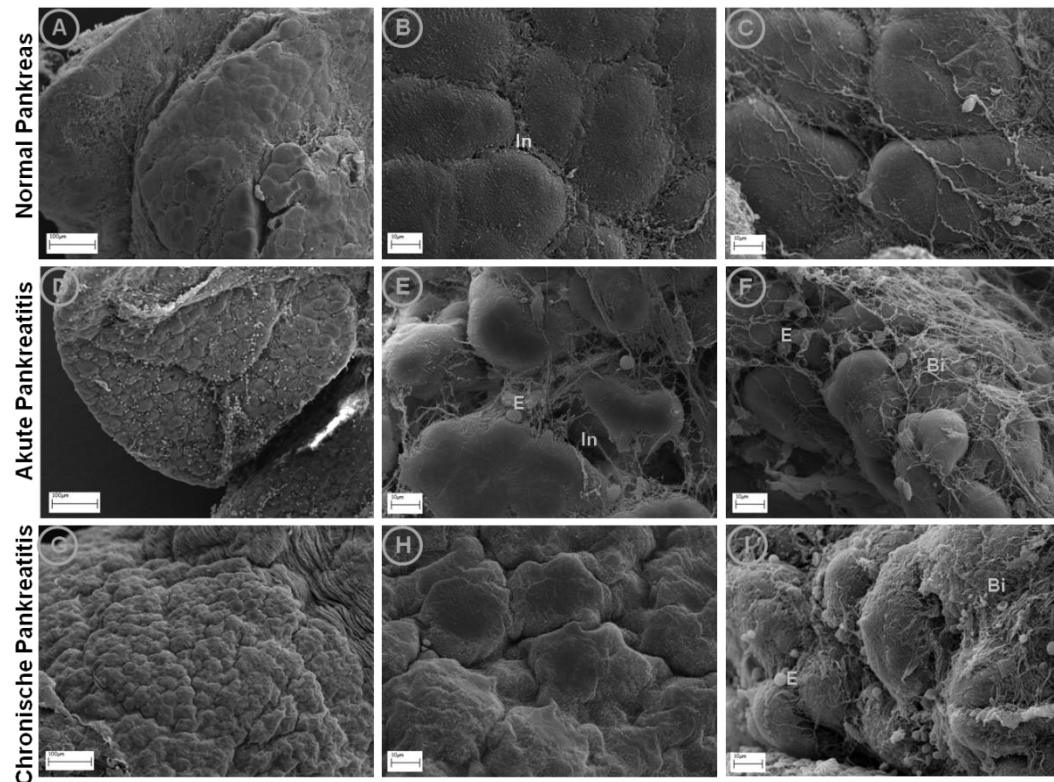


Abbildung 29: REM Vergleichende Darstellung von NP, AP und CP. Die obere Reihe zeigt Bilder von einem Normal Pankreas verschiedener Vergrößerungen (A, B, C). Die mittlere Reihe zeigt Bilder der akuten Pankreatitis (D, E, F). Durch das Ödem entstandene, verbreiterte Interazinärräume wird das dünne Bindegewebe spinnennetzartig aufgespannt (E, F). Die untere Reihe (G, H, I) zeigt das chronisch veränderte Pankreas, welches im Gegensatz zu der akuten Pankreatitis vermehrtes, kompaktes, festes Bindegewebe aufweist. E=Entzündungszelle, In=Interzellularräum, Bi=Bindegewebe

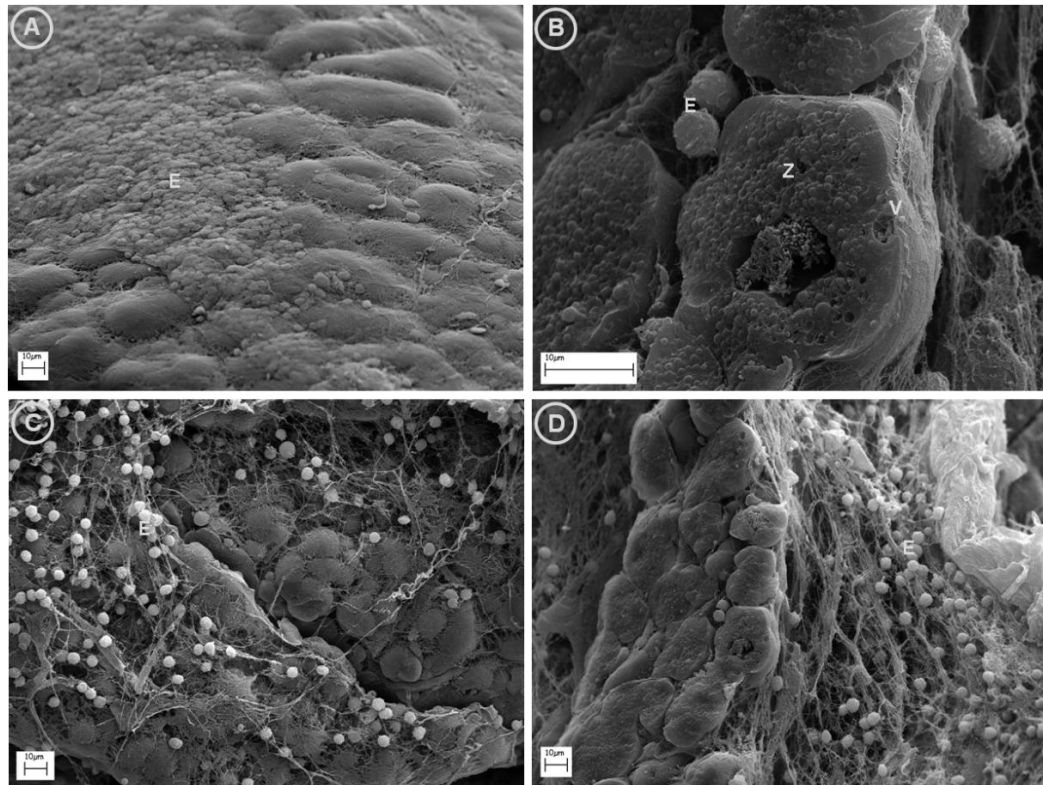


Abbildung 30: REM pathologische Veränderungen der akuten Pankreatitis. (A) Entzündungszell-Invasion. (B) Aufgebrochener Azinus, im Randbereich ist eine Vakuole zu erkennen. (C,D) Starke Entzündungszellinfiltration. E=Entzündungszelle, Z= Zymogengranula, V=Vakuole

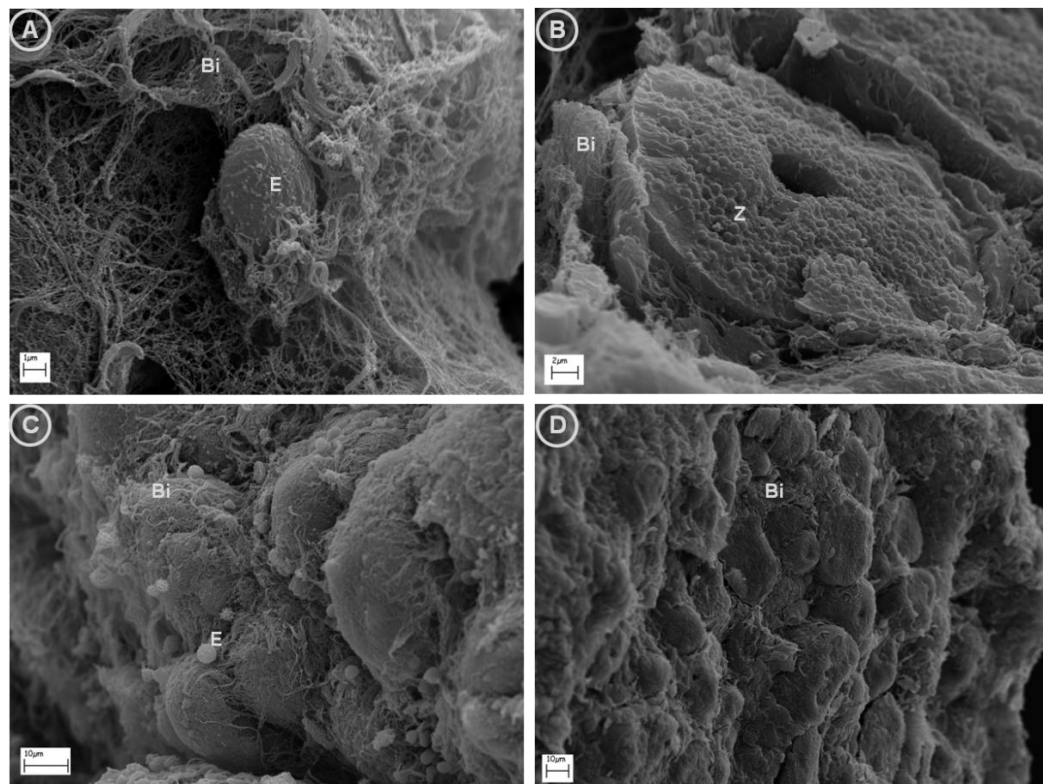


Abbildung 31: REM pathologische Veränderungen der chronischen Pankreatitis. (A) Entzündungszelle in kompaktem Bindegewebe. (B,C,D) Abgerundete Azini umgeben von kompaktem festen Bindegewebe mit zum Teil Entzündungszellinfiltraten. E=Entzündungszelle, Z= Zymogengranula, Bi=Bindegewebe

4.2 Ödembestimmung im Pankreasgewebe

Im Rahmen der entzündlichen Prozesse in der akuten Pankreatitis kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Kapillaren. Die hierbei ins Gewebe austretende Flüssigkeit bildet das pankreatische Ödem. Um dieses nach einer supramaximalen Stimulation mit Caerulein zu bestimmen, wurde das Gewebeödem im Pankreas durch die Ermittlung des Verhältnisses vom Nass- zum Trockengewicht ermittelt. Die quantitative Auswertung des akuten Pankreatitis-Versuchs zeigte keine signifikanten Unterschiede. Es war lediglich ein Trend zu erkennen, dass der Flüssigkeitsverlust bei den Versuchsgruppen (WT $77.44 \pm 2.56\%$, KO $78.22 \pm 1.36\%$, AK $77.09 \pm 0.79\%$) größer als bei den Kontrollgruppen (cWT $75.97 \pm 4.81\%$, cKO $74.90 \pm 1.58\%$) war (Abb.32). Im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis konnte signifikant mehr Flüssigkeit im Pankreasgewebe bei den Versuchsgruppen (WT $80.25 \pm 3.13\%$, KO $81.74 \pm 3.19\%$) als bei den Kontrollgruppen (cWT $71.81 \pm 2.04\%$, cKO $70.28 \pm 3.16\%$) festgestellt werden (Abb.32).

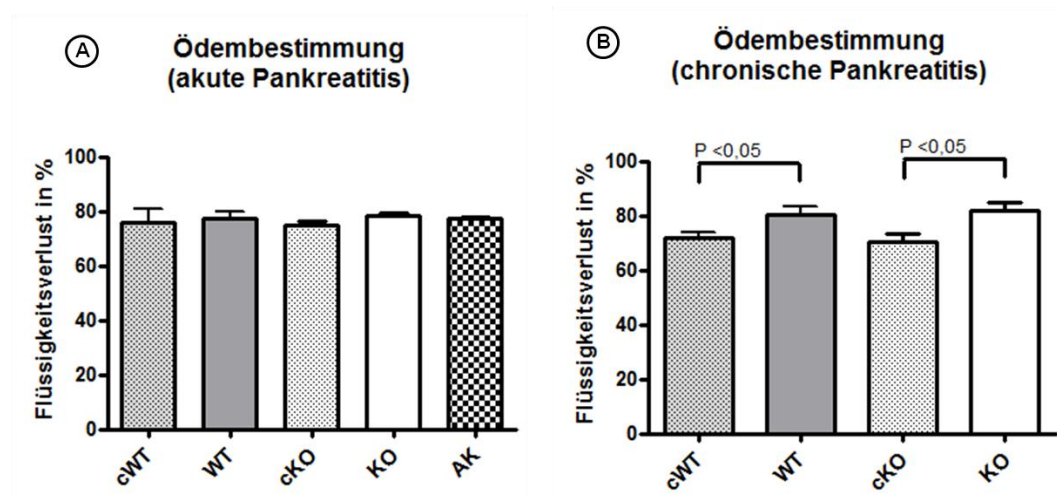


Abbildung 32: Graphische Darstellung des Flüssigkeitsverlustes im Pankreasgewebe (Ödem). Die linke Graphik (A) zeigt einen Trend der Versuchsgruppen (WT, KO, AK) zum höheren Flüssigkeitsverlust (Ödem). Die rechte Graphik (B) zeigt einen signifikant höheren Flüssigkeitsverlust der Versuchsgruppen (WT $80.25 \pm 3.13\%$, KO $81.74 \pm 3.19\%$) als bei den Kontrollgruppen (cWT $71.81 \pm 2.04\%$, cKO $70.28 \pm 3.16\%$) im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis.

4.3 Amylase und Lipase Werte

Starke erhöhte α -Amylase und Lipase Werte im Serum sind Indikatoren für einen akuten pankreatischen Schaden. Eine supramaximale Stimulation mit Caerulein erhöhte hoch signifikant die α -Amylase- (WT $13171 \pm 2122 \text{ U/l}$), KO $18019 \pm 2787 \text{ U/l}$, AK $8677 \pm 1294 \text{ U/l}$) und Lipase-Aktivität (WT $330.7 \pm 61.9 \text{ U/l}$, KO 356.0 ± 58.2 , AK $204.0 \pm 61.5 \text{ U/l}$) im Serum im Vergleich zu den Kontrolltieren (α -Amylase: cWT $24.56 \pm 62.95 \text{ U/l}$, cKO $25.30 \pm 53.63 \text{ U/l}$; Lipase: cWT $43.32 \pm 10.51 \text{ U/l}$, cKO $31.83 \pm 1.82 \text{ U/l}$) (Abb.33). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen WT und KO konnte nicht festgestellt werden und zeigt somit einen ähnlich schweren pankreatischen Schaden bei den Versuchsgruppen. Die AK-Gruppe zeigte signifikant erniedrigte Amylase und Lipase Werte.

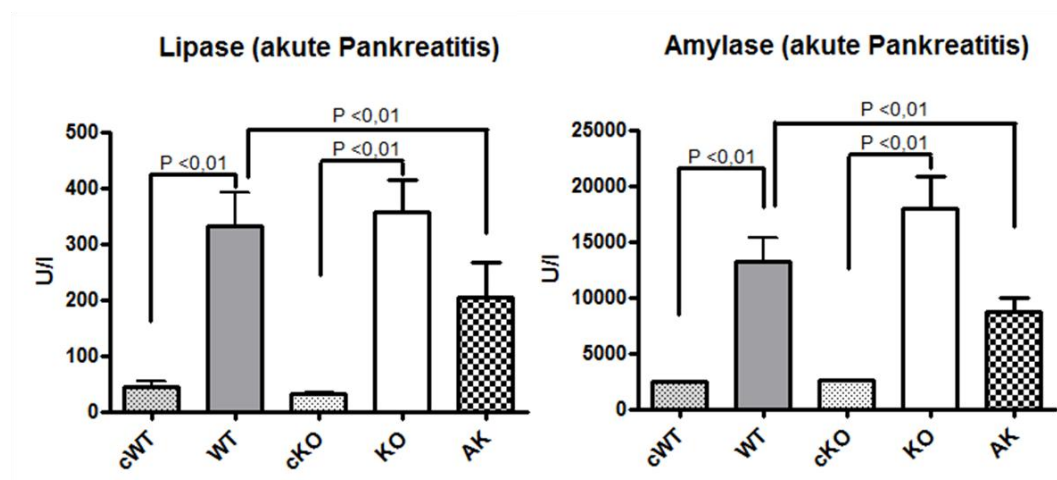


Abbildung 33: Graphische Darstellung der α -Amylase und Lipase Werte im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis. Alle Versuchsgruppen (WT, KO, AK) hatten für eine Pankreatitis typisch hoch signifikant erhöhte Amylase und Lipase Werte. Die Amylase und Lipase Werte der AK-Gruppe war signifikant erniedrigt.

In dem Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis befanden sich alle α -Amylase und Lipase Werte erwartungsgemäß im Referenzbereich. Bei dem generell als sensibler eingestuften Lipase-Wert, zeigte sich bei den Versuchsgruppen WT ($28.41 \pm 1.98 \text{ U/l}$) und KO ($31.82 \pm 2.99 \text{ U/l}$) eine deutlich verminderte Aktivität als bei den Kontrollgruppen (cWT $44.33 \pm 4.59 \text{ U/l}$, cKO $42.33 \pm 6.12 \text{ U/l}$), die zwischen der WT- und cWT-Gruppe mit $p < 0,05$ signifikant ist. Aufgrund des progressiven pankreatischen Schadens kommt es im Endstadium zu einer schweren Pankreasinsuffizienz („ausgebranntes Pankreas“) mit verminderter Aktivität von Lipase und Amylase im Serum der Patienten mit einer chronischen

Pankreatitis. Dieses Phänomen könnte sich hier andeuten (Abb. 34).

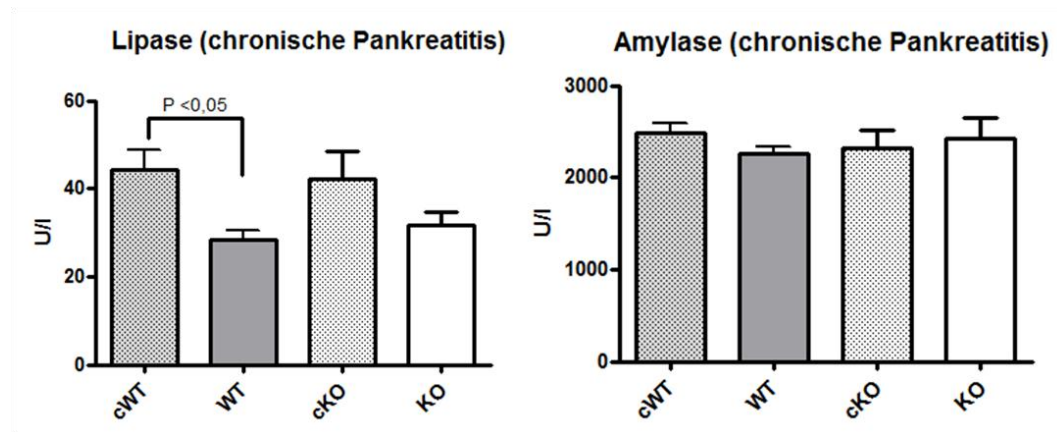


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Amylase und Lipase Werte im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis. Alle Werte befanden sich im Referenzbereich. Die Lipase Werte zeigen eine verminderte Aktivität der Versuchsgruppen (WT $28.41 \pm 1.98 \text{ U/l}$, KO $31.82 \pm 2.99 \text{ U/l}$) als bei den Kontrollgruppen (cWT $44.33 \pm 4.59 \text{ U/l}$, cKO $42.33 \pm 6.12 \text{ U/l}$).

4.4 Histopathomorphologische Analyse via Spormannscore

Die histopathomorphologische Analyse nach Spormann untersucht den Schweregrad des Ödems, sowie das Auftreten von inflammatorischen Infiltraten, Nekrosen und Hämorrhagien. Durch dieses etablierte Scoring-system wird der Schweregrad der Pankreatitis klassifiziert. Die Analyse zeigte in dem Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis erwartungsgemäß einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen. Zwischen den Versuchsgruppen (WT 2.58 ± 0.25 , KO 2.68 ± 0.31) konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in dem Schweregrad der akuten Pankreatitis festgestellt werden (Abb.35). Die AK-Gruppe (3.66 ± 0.30) zeigt im Vergleich zu der WT- und KO-Gruppe eine signifikant schwerere Pankreatitis (Abb.35).

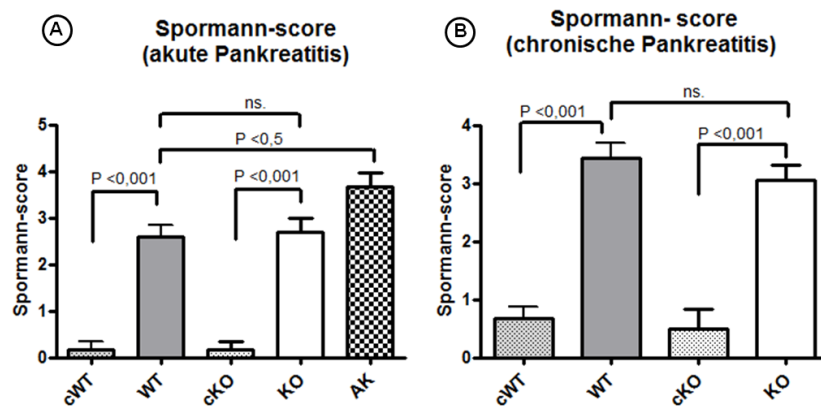


Abbildung 35: Graphische Darstellung der histopathomorphologischen Analyse nach Spormann. (A) Unterschiede im Schweregrad der Pankreatitis zwischen der WT- und der KO-Gruppe konnten nicht gezeigt werden. Der Spormann Score der AK-Gruppe unterschied sich signifikant von denen der KO- und WT-Gruppe. (B) Im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (WT 3.43 ± 0.25 , KO 3.05 ± 0.26) festgestellt werden.

In dem Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (WT 3.43 ± 0.25 , KO 3.05 ± 0.26) festgestellt werden (Abb.35).

4.5 Verhaltensbiologische Studien bei induzierter akuter Pankreatitis

4.5.1 Open-Field-Test

Die Verhaltensweisen (Frei-Aufrichten „*Rearing*“, Putzen, Sprünge, Kratzen, bauchwärts Blicken, Defäkation, Urinieren) sowie die Laufstrecken der Tiere, wurden in dem Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis, in einem Zeitraum von 8 Minuten, mit einer CCD-Kamera gefilmt, und anschließend die Videos hinsichtlich der oben genannten Verhaltensweisen ausgewertet.

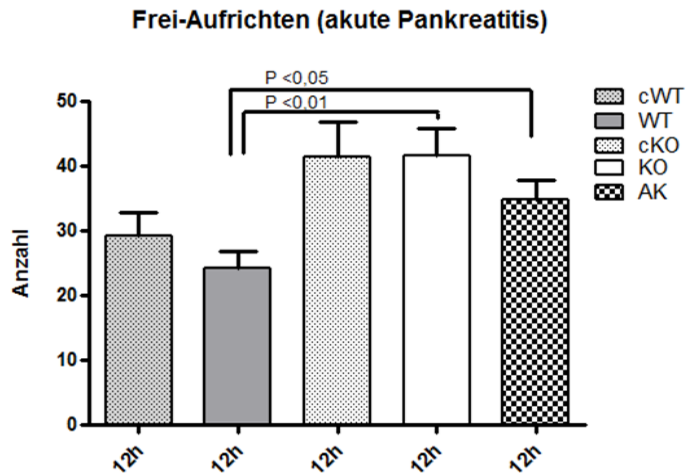


Abbildung 36: Graphische Darstellung des Aufrichtungsverhaltens im Versuchsverlauf der akuten Pankreatitis. Die Anzahl des Aufrichtens ist nach 10 maliger Caerulein/NaCl Injektion (12h) angegeben. Auffällig war die reduzierte Aufrichtungsanzahl der WT-Gruppe (24.29 ± 2.61) nach 12 Stunden, die im Vergleich zur KO- (41.60 ± 4.17) und AK-Gruppe (34.83 ± 3.01) signifikant ist.

Die Tiere der WT-Gruppe zeigten eine deutliche Abnahme des Freiaufrichtens im Gegensatz zu allen anderen Versuchsgruppen (Abb.36). Der Unterschied zwischen den WT- (24.29 ± 2.61) und KO-Mäusen (41.60 ± 4.17) bei der 12 Stunden Messung war hoch signifikant. Auch die antikörperbehandelten Mäuse (34.83 ± 3.01) zeigten eine signifikant niedrigere Freiaufrichtung gegenüber der WT-Gruppe.

Verhalten (akute Pankreatitis)

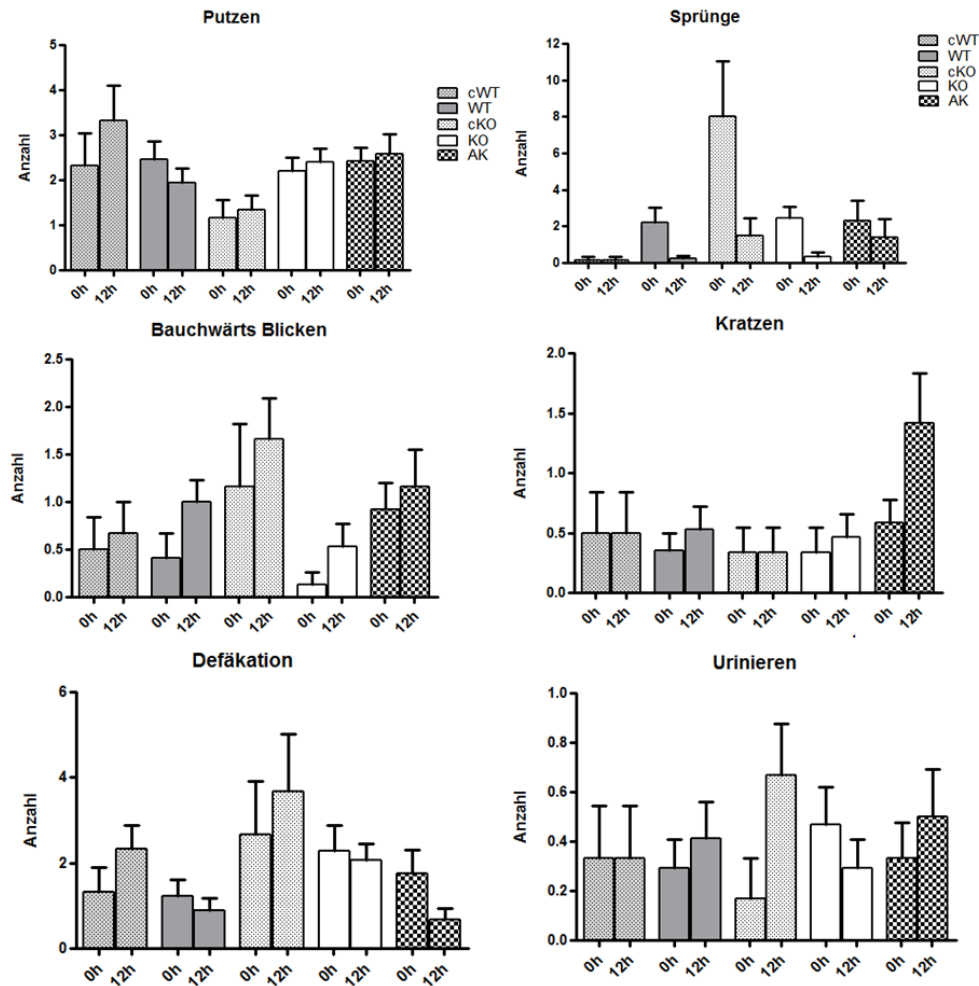


Abbildung 37: Graphische Darstellung der Verhaltensweisen Putzen, Sprünge, bauchwärts Blicken, Kratzen, Defäkation und Urinieren beim Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis. Die Anzahl des Putzens als Aktivitätshinweis nimmt bei allen Versuchsgruppen, außer der WT-Gruppe im Versuchsverlauf zu.

Die Verhaltensweisen Putzen, Sprünge, bauchwärts Blicken, Kratzen, Defäkation und Urinieren zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auffällig ist die abnehmende Putzaktivität der WT-Mäuse. Bei allen anderen Versuchsgruppen konnte eine Steigerung des Putzverhaltens im Versuchsverlauf festgestellt werden (Abb.37). Die sowieso sehr geringe Anzahl an Sprüngen nahm bei allen Mäusen während des Versuchsverlaufs ab. Hierbei ist wahrscheinlich die Beobachtungszeit nicht lange genug gewesen, da die Anzahl dieser Verhaltensweisen sehr gering war.

Bei den Verhaltensweisen bauchwärts Blicken und Kratzen wurde bei allen Tieren der Versuchsgruppen ein nicht signifikanter Anstieg beobachtet. Die Kontrolltiere

(cWT, cKO) hingegen zeigten im Vergleich keine wesentlichen Veränderungen.

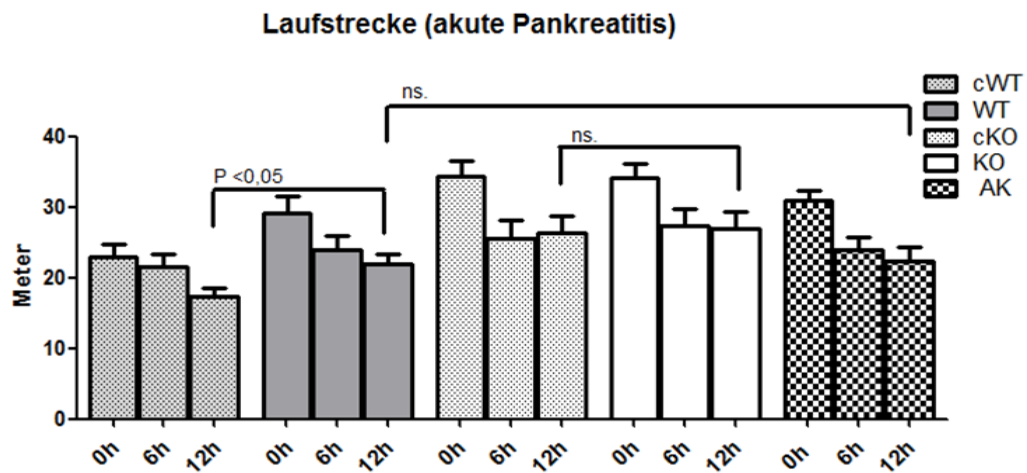


Abbildung 38: Graphische Darstellung der Laufstrecke im Versuchsverlauf. Im Versuchsverlauf zeigten alle Versuchsgruppen eine kontinuierliche Abnahme der Laufstrecke. Die WT-Tiere ($22.02 \pm 1.24\text{m}$) haben bei der 12 Stundenmessung im Verhältnis zu ihrer cWT-Kontrollgruppe ($17.27 \pm 1.35\text{m}$) eine weitere Laufstrecke zurückgelegt als die KO-Tiere ($26.92 \pm 2.47\text{m}$) im Vergleich zu ihrer cKO-Kontrollgruppe ($26.37 \pm 2.43\text{m}$). Bei den AK-Tieren ($22.29 \pm 1.97\text{m}$) zeigten sind nach 12h ebenfalls kein signifikanter Unterschied zur cWT-Kontrollgruppe.

Während des Versuchsverlaufs zeigten alle Versuchsgruppen eine kontinuierliche Abnahme der Laufstrecke. Bei der finalen Messung nach 12 Stunden haben sich die Tiere der WT-Gruppe ($22.02 \pm 1.24\text{m}$) im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe cWT ($17.27 \pm 1.35\text{m}$) signifikant mehr bewegt. Die Laufstrecke der Tiere der KO-Gruppe ($26.92 \pm 2.47\text{m}$) zu ihrer Kontrollgruppe cKO ($26.37 \pm 2.43\text{m}$), zeigten hingegen keinen Unterschied. Bei den Tieren die eine CX3CR1 Antikörper Behandlung bekamen ($22.29 \pm 1.97\text{m}$), wurde ebenfalls bei der 12h Messung kein signifikanter Unterschied in der Laufstrecke beobachtet (Abb. 38).

4.5.2 Evoziertes Schmerzverhalten (Von-Frey-Filamente)

Der evozierte Schmerz wurde durch die Von-Frey-Filamente evaluiert. Mit diesem Versuch sollte die mögliche Wirkung des CX3CR1^{-/-} knock-out auf das Schmerzverhalten bei induzierter akuter Pankreatitis untersucht werden. Durch eine initiale Messung wurde bei allen Tieren eine Grundsensibilität ermittelt. Bei einem exemplarisch gewähltem Filament 2,36mN, reagierten die Kontrollgruppen cWT 3.33 ± 0.61 und cKO 3.00 ± 0.51 mal. Die Versuchsgruppen reagierten vor

Caeruleingabe 2.64 ± 0.28 (WT) 3.47 ± 0.32 (KO) 3.08 ± 0.22 (AK) mal. Bei den Tieren der Kontrollgruppen blieb diese Grundempfindlichkeit während des gesamten Versuchs weitgehend gleich. (Abb.41). Die Versuchsgruppen zeigten bereits bei der Messung nach 6 Stunden signifikante ($p < 0.01$) Unterschiede in den Schmerzreaktionen. Die WT-Gruppe zeigte bei der exemplarisch gewählten Filamentstärke 2.36mN eine Schmerzreaktion von (7.68 ± 0.58) im Gegensatz zu der KO-Gruppe die mit (5.23 ± 0.34) erheblich reduziertes Schmerzempfinden zeigten. Auch bei den mit Antikörpern behandelten Mäusen war die Nociception nach 6 Stunden mit (5.25 ± 0.37) deutlich reduziert. Diese Beobachtung zeigte sich noch deutlicher bei der Messung nach 12 Stunden ($p < 0.01$) (Abb.39). Hierbei reagierten die WT-Gruppe bei dem Filament 2.36mN 8.58 ± 0.65 mal. Die KO-Gruppe zeigte nur eine Nociception von 5.64 ± 0.32 . Die AK-Gruppe zeigte ebenfalls nur eine Schmerzreaktion von 5.66 ± 0.33 . Die mit Antikörpern behandelten Mäuse zeigten ebenfalls nach 6 und nach 12 Stunden ein signifikant ($p < 0.01$) reduziertes Schmerzverhalten verglichen mit der WT-Gruppe (Abb.40).

Von-Frey-Filament-Test (WT, KO) (akute Pankreatitis)

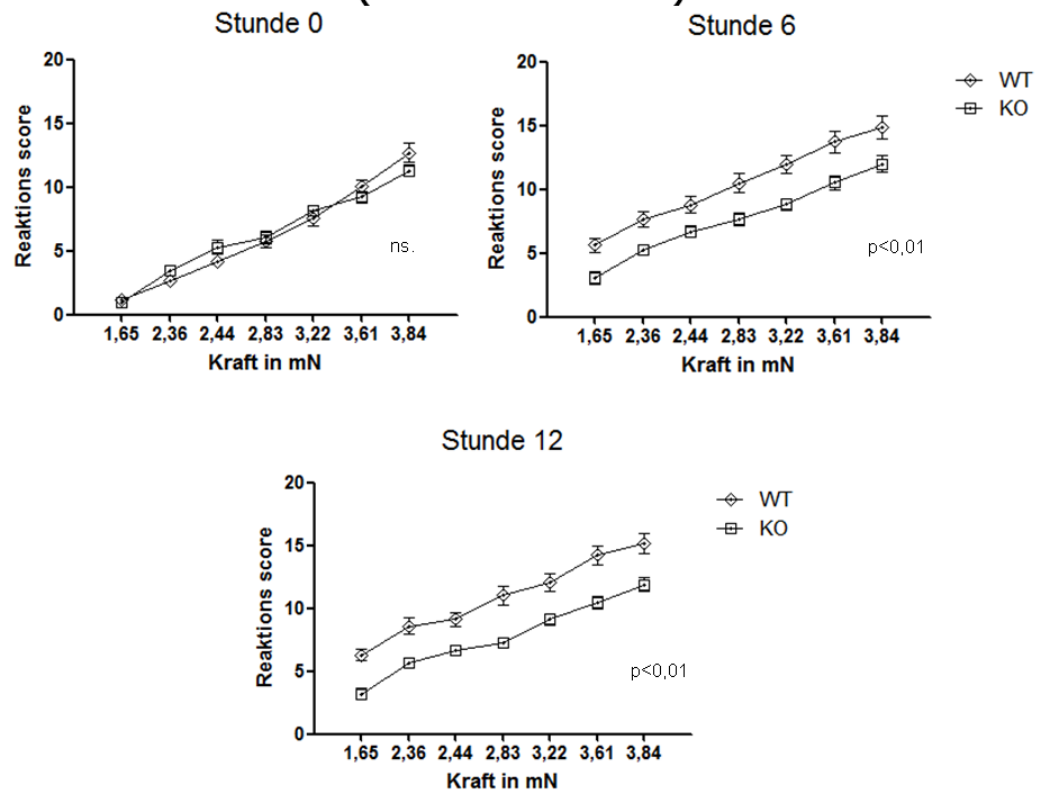


Abbildung 39: WT und KO Vergleich im Von-Frey-Filament-Test im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis. Diese Graphen zeigen die unterschiedliche Schmerzschwelle der WT- und KO-Versuchsgruppe im zeitlichen Verlauf (0h, 6h, 12h). Vor Caerulein Injektionen zeigen WT und KO weitgehend die gleiche Sensibilität, 6 bzw. 12 Stunden nach den Caerulein Injektionen war die Schmerzschwelle bei den KO-Tiere hoch signifikant ($p<0,01$) reduziert. Die angegebenen mN Werte auf der X-Achse wurden zur einfacheren graphischen Darstellung entsprechend den vorgegebenen Filamentstärken der Von-Frey-Filamente gewählt und nicht maßstabsgetreu abgebildet.

Von-Frey-Filament-Test (WT, AK) (akute Pankreatitis)

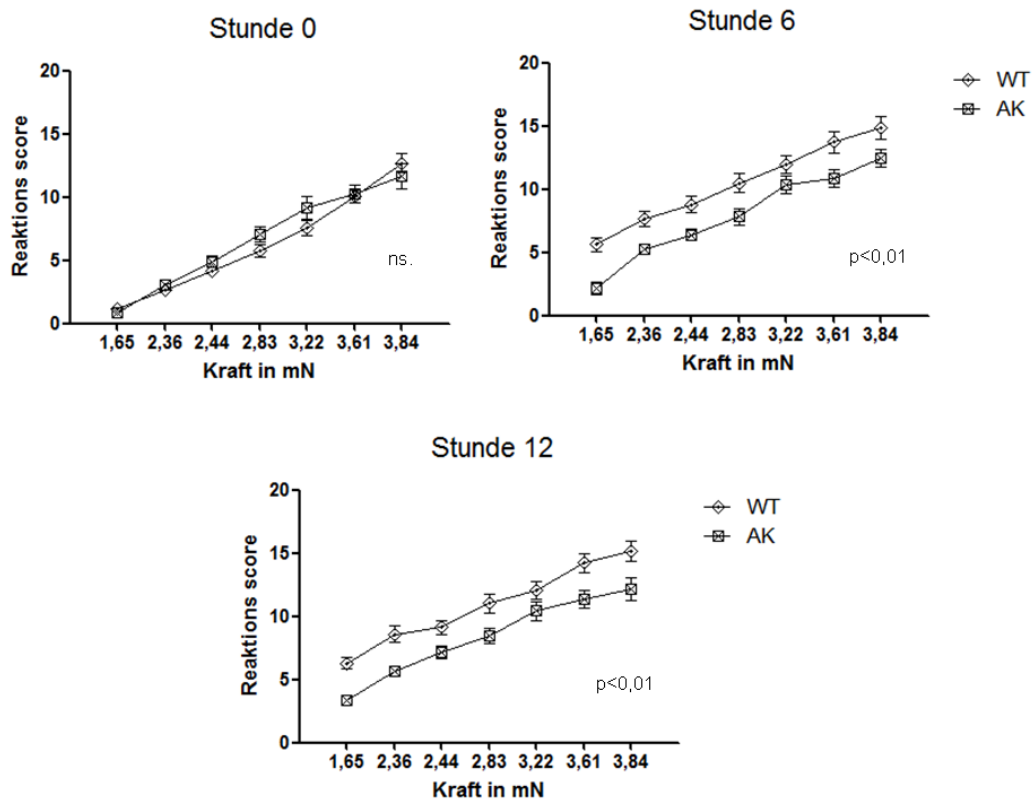


Abbildung 40: WT und AK Vergleich im Von-Frey-Filament-Test im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis. Diese Graphen zeigen die unterschiedliche Schmerzschwelle der WT- und AK-Versuchsgruppe im zeitlichen Verlauf (0h, 6h, 12h). Vor Caerulein Injektionen zeigen WT und AK weitgehend die gleiche Sensibilität. Nach 6h zeigte sich ein hoch signifikanter ($p<0.01$) Unterschied in den Schmerzassoziierten Reaktionen von den AK-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren. Der sich nach 12h ebenfalls hoch signifikant ($p<0.01$) darstellte. Die angegebenen mN Werte auf der X-Achse wurden zur einfacheren graphischen Darstellung entsprechend den vorgegebenen Filamentstärken der Von-Frey-Filamente gewählt und nicht maßstabsgetreu abgebildet.

Von- Frey- Filament- Test (cWT, cKO) (akute Pankreatitis)

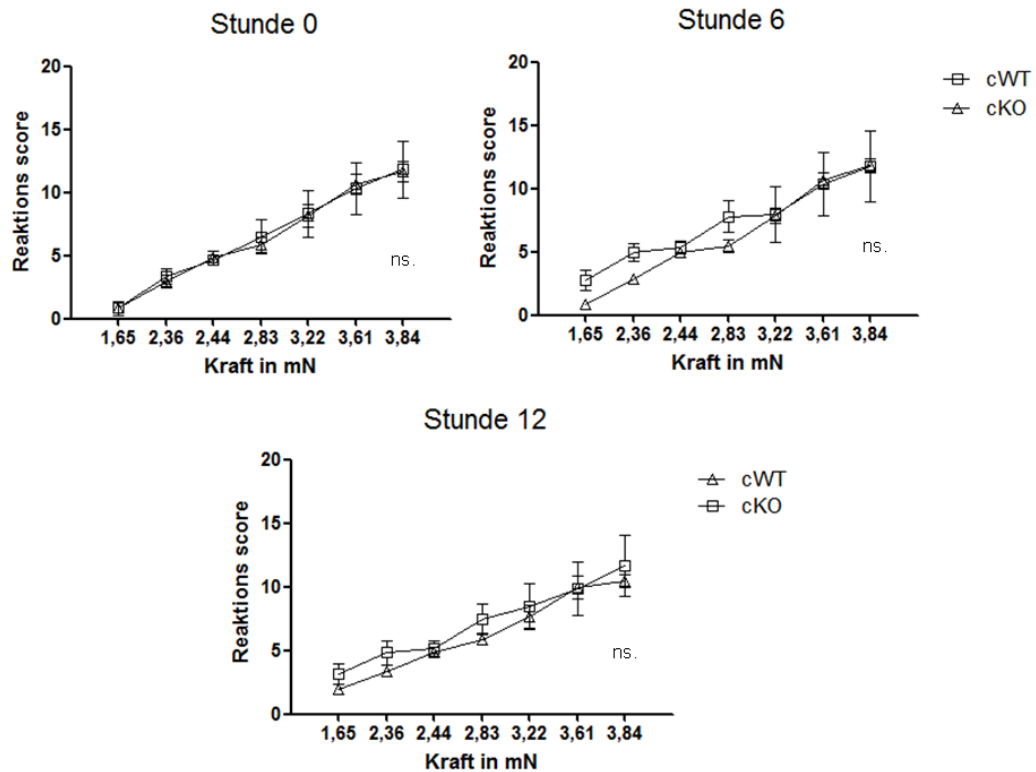


Abbildung 41: cWT und cKO Vergleich im Von-Frey-Filament-Test im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis. Die Kontrolltiere blieben in ihrer Sensibilität weitgehend gleich. Es konnten hierbei zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die angegebenen mN Werte auf der X-Achse wurden zur einfacheren graphischen Darstellung entsprechend den vorgegebenen Filamentstärken der Von-Frey-Filamente gewählt und nicht maßstabsgetreu abgebildet.

4.5.3 Körpergewichtsverlust

Die Versuchstiere wurden vor Versuchsbeginn und direkt nach den letzten Messungen gewogen. Die Tiere der KO-Gruppe ($3.30 \pm 0.40\%$) haben hoch signifikant ($p < 0.0001$) weniger an Körpergewicht verloren als die Mäuse der WT-Gruppe ($6.90 \pm 0.58\%$) (Abb.42). Bei den durch Antikörper behandelten Tieren war der Gewichtsverlust ebenfalls hoch signifikant ($p < 0.001$) reduziert.

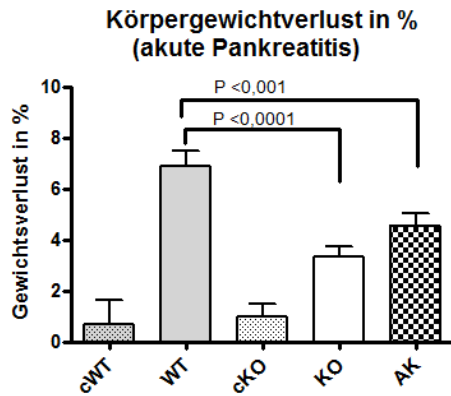


Abbildung 42: Graphische Darstellung des Körpergewichtsverlustes im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis. Die Tiere der KO- ($3.30 \pm 0.40\%$) und AK-Gruppe ($4.55 \pm 0.46\%$) haben hoch signifikant weniger an Gewicht verloren als die WT-Tiere ($6.90 \pm 0.58\%$). Die beiden Kontrollgruppe (cWT $0.67 \pm 0.97\%$) und cKO ($0.99 \pm 0.47\%$) haben in etwa gleich wenig abgenommen.

4.6 Verhaltensbiologische Studien bei induzierter chronischen Pankreatitis

4.6.1 Open-Field-Test

Wie bei der akuten Pankreatitis wurden im chronischen Pankreatitis-Versuch im Open-Field-Test die Verhaltensweisen (Frei-Aufrichten „*Rearing*“, Putzen, Sprünge, Kratzen, bauchwärts Blicken, Defäkation, Urinieren), sowie die Laufstrecken der Tiere evaluiert. Allerdings wurde den Mäusen jeweils eine 5 minütige Eingewöhnungszeit gegeben, bevor sie dann 5 Minuten gefilmt wurden.

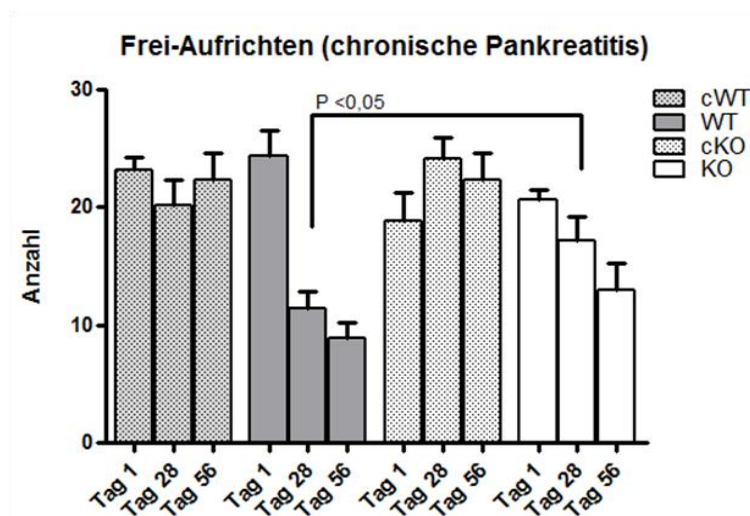


Abbildung 43: Graphische Darstellung des Aufrichtungsverhaltens im chronischen Versuchsverlauf. Bei beiden Versuchsgruppen (WT, KO) nimmt die Anzahl des Aufrichtens am Tag 28 und 56 ab. Auffällig ist hierbei die signifikant reduzierte Aufrichtungsanzahl der WT-Gruppe (11.38 ± 1.50) am Tag 28 im Vergleich zur KO-Gruppe (17.19 ± 2.00). Auch am Tag 56 zeigten die KO-Tiere mehr Aufrichtungsvermögen, die sich allerdings nicht signifikant darstellen ließ. Die beiden Kontrollgruppen (cWT, cKO) zeigen nahezu konstant die gleiche Aufrichtungsanzahl.

Bei der WT- und KO-Gruppe nahm während des Versuchsverlaufs die Anzahl des Freiaufrichtens ab. Die Tiere der WT-Gruppe zeigten nach Caerulein-Gabe ein zum Teil signifikant reduziertes Aufrichtungsvermögen im Gegensatz zu der KO-Gruppe. Die Kontrolltiere blieben in der Anzahl weitgehend konstant (Abb.43).

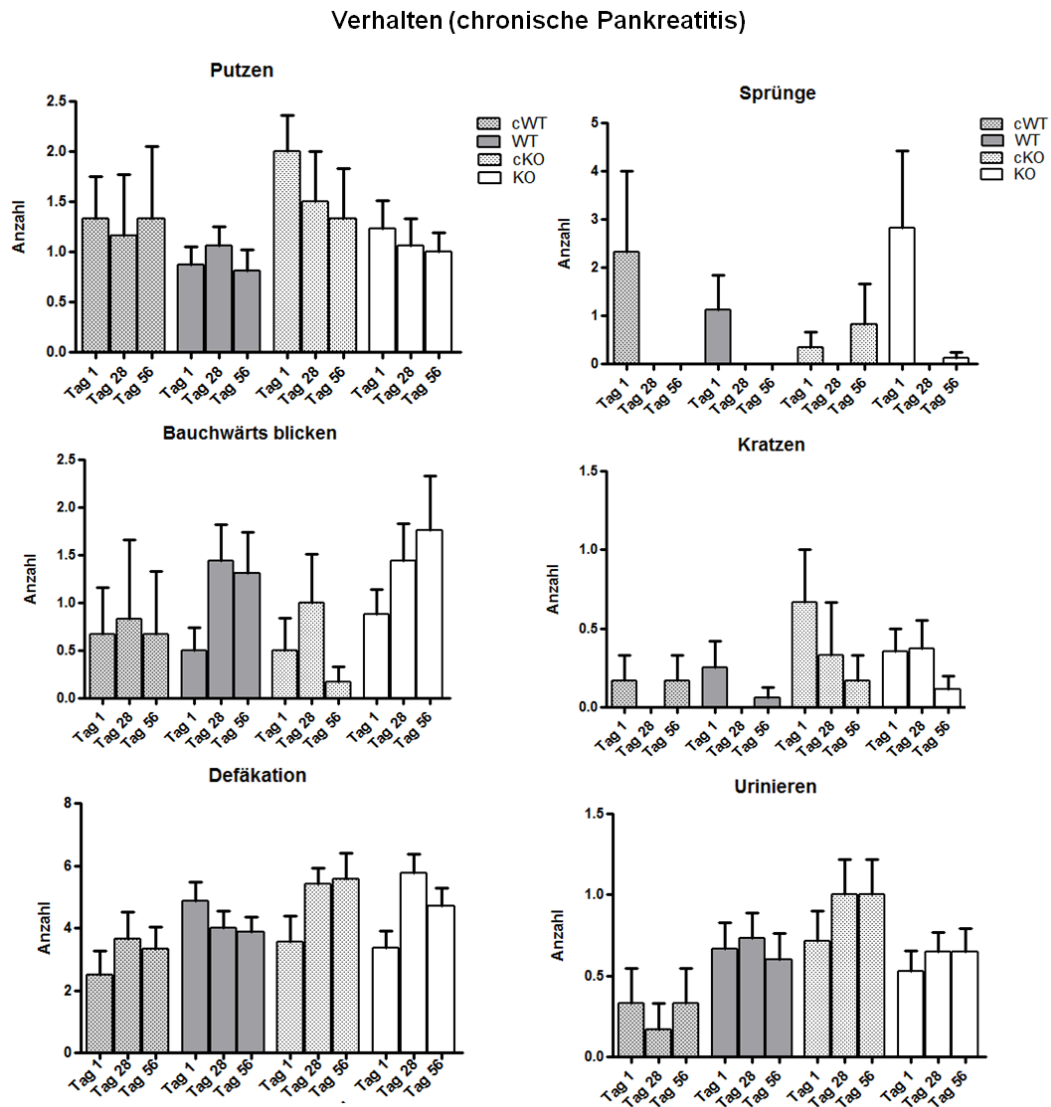


Abbildung 44: Graphische Darstellung der Verhaltensweisen Putzen, Sprünge, Kratzen, bauchwärts Blicken, Defäkation, Urinieren beim Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis. Durch die geringe Anzahl aller dieser Verhaltensweisen wurden keine Signifikanzen beobachtet.

Die Dokumentation der Verhaltensweisen von Putzen, Sprünge, Kratzen, bauchwärts Blicken, Defäkation, Urinieren ergaben bei allen Versuchs-Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb.44). Wie im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis kann vermutet werden, dass die Anzahl der Verhaltensweisen zu gering war.

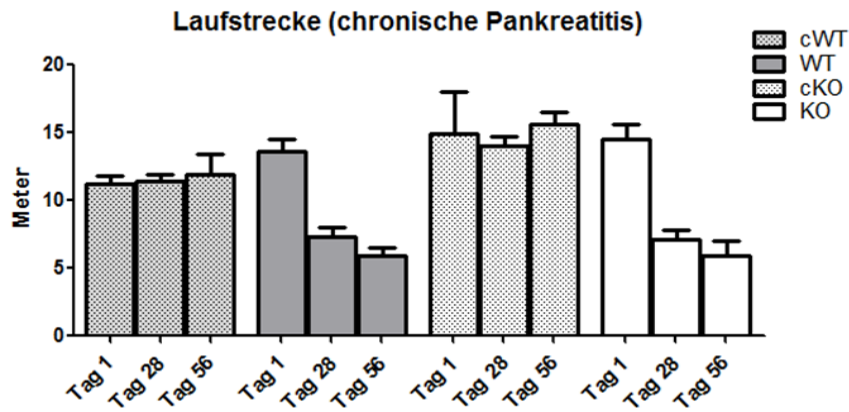


Abbildung 45: Graphische Darstellung der Laufstrecke im chronischen Pankreatitis Versuchsverlauf. Beide Versuchsgruppen (WT, KO) zeigten verminderte Lokomotion am Tag 28 (WT: $7.28 \pm 0.68\text{m}$ /KO: $7.04 \pm 0.75\text{m}$) und Tag 56 (WT: $5.90 \pm 0.59\text{m}$ /KO: $5.86 \pm 1.05\text{m}$). Die Kontrollgruppen (cWT, cKO) blieben in ihrer Laufstrecke nahezu konstant.

Bei der Ermittlung der Laufstrecke zeigten beide Versuchsgruppen mit chronischer Pankreatitis eine deutliche Abnahme der Laufaktivität. Die sich am Tag 28 (WT $7.28 \pm 0.68\text{m}$,KO $7.04 \pm 0.75\text{m}$) im Gegensatz zum Tag 1 (WT $13.60 \pm 0.82\text{m}$,KO $14.50 \pm 1.03\text{m}$) am deutlichsten darstellte. Die Laufstrecke der cWT-Gruppe blieb nahezu unverändert hoch (Tag 1: $11.15 \pm 0.64\text{m}$, Tag 28: $11.38 \pm 0.47\text{m}$, Tag 56: $11.19 \pm 1.43\text{m}$; Abb.45). Auch die cKO-Gruppe zeigte nahezu gleichbleibende Lokomotion (Tag 1: $14.85 \pm 3.13\text{m}$, Tag 28: $13.92 \pm 0.78\text{m}$, Tag 56: $15.53 \pm 0.94\text{m}$)

4.6.2 Evoziertes Schmerzverhalten (Von-Frey-Filamente)

Das evozierte Schmerzverhalten bei den Mäusen mit induzierter chronischer Pankreatitis wurde analog zum Versuchsansatz der akuten Pankreatitis mit den Von-Frey-Filamenten durchgeführt. Die Messung des ersten Tages zeigte bei allen Versuchsgruppen eine weitgehend gleiche Grundsensibilität die sich bei den Kontrolltieren während des 8 wöchigen Versuchs auch nicht nennenswert veränderte (Abb.47). Bei exemplarisch gewählten Filament von 2.36mN , zeigten die Gruppen bei der ersten Messung eine Reaktion von 2.50 ± 0.56 (cWT) 3.33 ± 0.80 (cKo) 3.17 ± 0.17 (WT) 3.52 ± 0.33 (KO). Auch bei einem exemplarisch stärkeren Filament- 3.22mN wird die weitgehende Grundsensibilität deutlich 7.00 ± 0.51 (cWT) 7.50 ± 1.17 (cKO) 8.35 ± 0.41 (WT) 9.17 ± 0.56 (KO). Die Versuchsgruppen, die Caerulein Injektionen bekamen, zeigten schon nach der ersten Woche hoch signifikante ($p < 0.01$) Unterschiede in ihrer

Berührungsempfindlichkeit. Die Tiere der KO-Gruppe zeigten nach 28 Tagen bei der Filamentstärke-2.36mN eine deutlich geringere Schmerzreaktion gegenüber der WT-Gruppe (5.82 ± 0.33 vs. 9.64 ± 0.20). Bei dem Filament 3.22mN war nach 28 Tagen ebenfalls eine stark reduzierte Schmerzreaktion der KO-Gruppe (9.70 ± 0.40) gegenüber der WT-Gruppe (12.35 ± 0.34) feststellbar, die sich signifikant während des gesamten Versuchsverlaufs immer deutlicher darstellte (Abb.46). Am Tag 56 zeigte die WT-Gruppe (10.38 ± 0.20) gegenüber der KO-Gruppe (5.58 ± 0.24) bei einer Filamentstärke von 2.36mN den deutlichsten Unterschied. Beim 3.22mN-Filament wurde das reduzierte Schmerzempfinden der KO-Gruppe (9.05 ± 0.34) gegenüber der WT-Gruppe (12.56 ± 0.37) am deutlichsten. Die unterschiedliche Schmerzreaktion der Versuchgruppen (WT,KO) konnte bei allen Filamentstärken beobachtet werden. Die deutlich reduzierte Berührungsempfindlichkeit der KO-Gruppe gegenüber der WT-Gruppe zeigte sich am deutlichsten bei den feineren Filamenten (1.65mN, 2.36mN, 2.44mN).

Von- Frey- Filament- Test (WT, KO) (chronische Pankreatitis)

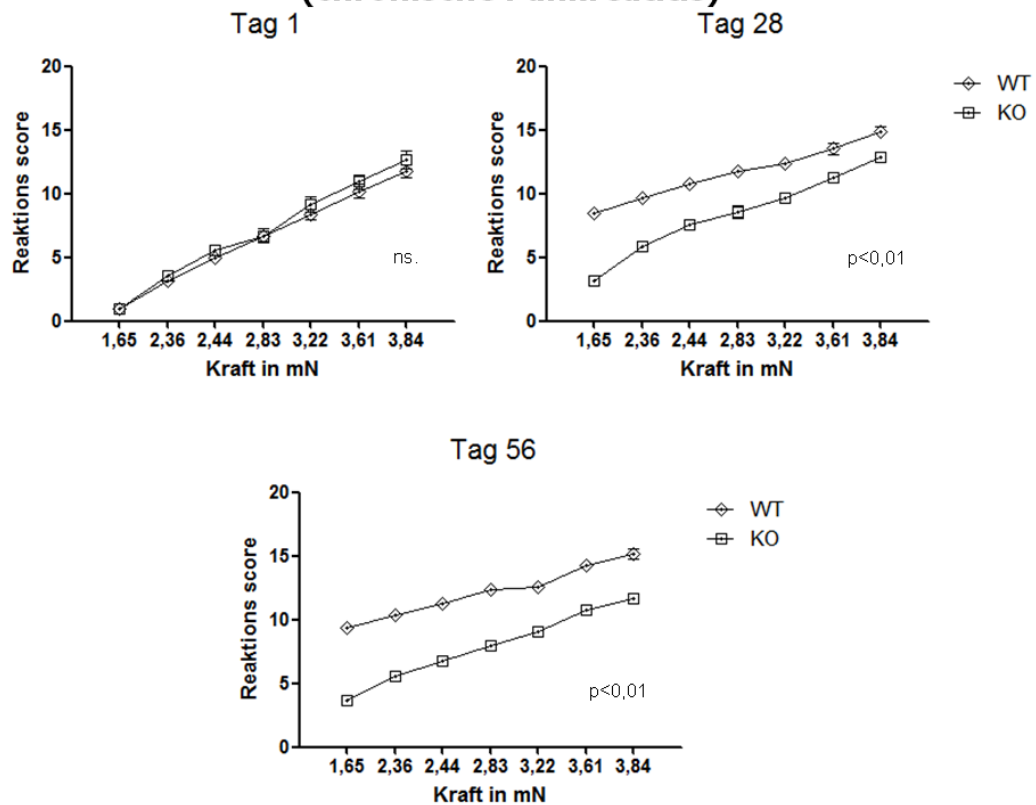


Abbildung 46: Von-Frey-Filament-Test (CP) von WT und KO im Vergleich. Vor caerulein Injektionen (Tag1) zeigen WT und KO nahezu die gleiche Sensibilität. Am Tag 28 zeigte sich eine hoch signifikant ($p < 0.01$) unterschiedliche Schmerzschwelle der WT- und KO-Versuchsgruppe die am Tag 56 ($p < 0.01$) noch deutlicher wurde. Die angegebenen mN Werte auf der X-Achse wurden zur einfacheren graphischen Darstellung entsprechend den vorgegebenen Filamentstärken der Von-Frey-Filamente gewählt und nicht maßstabsgetreu abgebildet.

Von-Frey-Filament-Test (cWT, cKO) (chronische Pankreatitis)

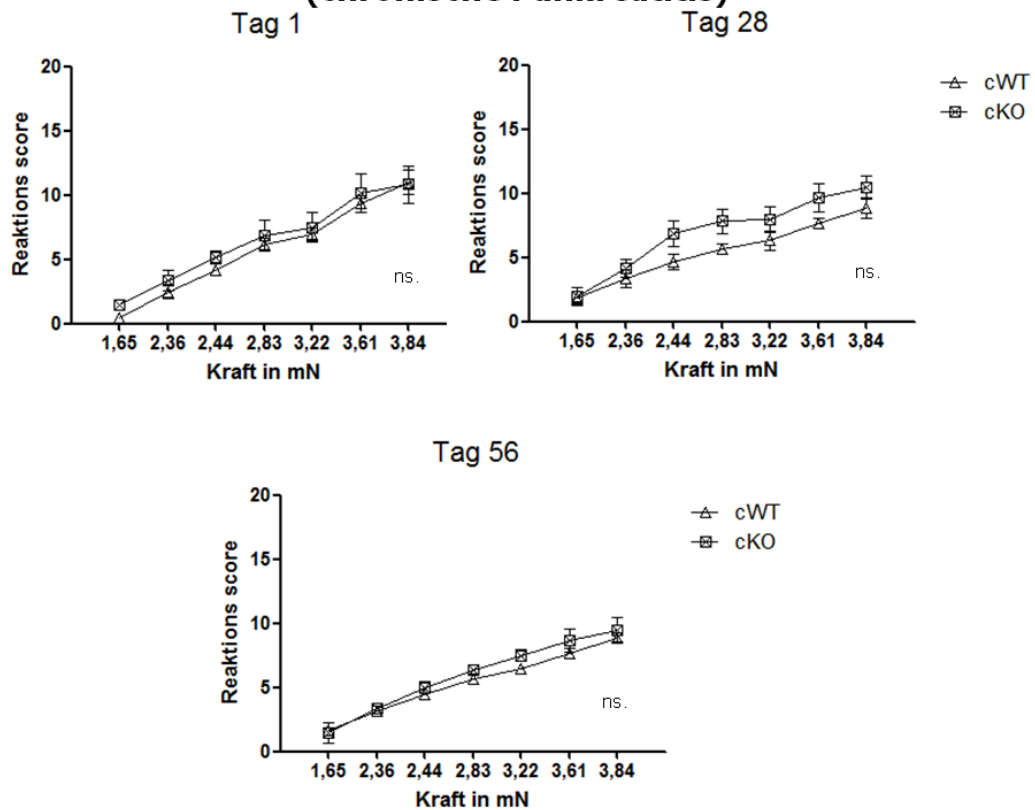


Abbildung 47: Von-Frey-Filament-Test (CP) von cWT und cKO im Vergleich. Die Kontrollgruppen (cWT, cKO) zeigen konstant über den gesamten 8 wöchigen Versuchszeitraum nahezu die gleiche Sensibilität. Die angegebenen mN Werte auf der X-Achse wurden zur einfacheren graphischen Darstellung entsprechend den vorgegebenen Filamentstärken der Von-Frey-Filamente gewählt und nicht maßstabsgetreu abgebildet.

4.6.3 Gewichtszunahme

Alle Tiere im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis wurden jeden zweiten Tag gewogen und im Gegensatz zu den Tieren mit akuter Pankreatitis hauptsächlich eine Körpergewichtszunahme beobachtet. Deutlich zeigte sich jedoch ein Gewichtsverlust bei den Tieren der WT-Gruppe in den ersten Tagen (Abb.48). Nach 7 Tagen konnte bei der WT-Gruppe praktisch keine Körpergewichtszunahme ($0.02\% \pm 0.91\%$) beobachtet werden. Die cWT-Tiere hingegen nahmen signifikant ($p < 0.05$) $4.97\% \pm 1.32\%$ an Gewicht zu. Nach der ersten Woche nahmen die WT-Tiere nicht signifikant nahezu parallel zu ihrer cWT-Kontrollgruppe an Gewicht zu. Der anfängliche Gewichtsverlust konnte bei den KO-Tieren nicht beobachtet werden, sie nahmen kontinuierlich zu. Ein signifikanter ($p < 0.05$) Unterschied der cKO und KO-Gruppe zeigte sich nur am

Tag 21 wo die cKO-Tiere eine Gewichtszunahme von $7.86 \pm 1.61\%$ und die KO-Tiere nur $3.06 \pm 0.70\%$. Nach wenigen Tagen konnte kein signifikanter Unterschied dieser beiden Gruppen mehr festgestellt werden. Am Tag 56 war nahezu kein Unterschied mehr feststellbar (KO $13.45 \pm 1.12\%$; cKO $14.66 \pm 3.52\%$). Der Verlauf bei den Tieren der KO-Gruppe zeigt eine relativ geringere Gewichtszunahme im Vergleich mit der WT-Gruppe. Aber einen weniger deutlichen Unterschied zur cKO-Kontrollgruppe.

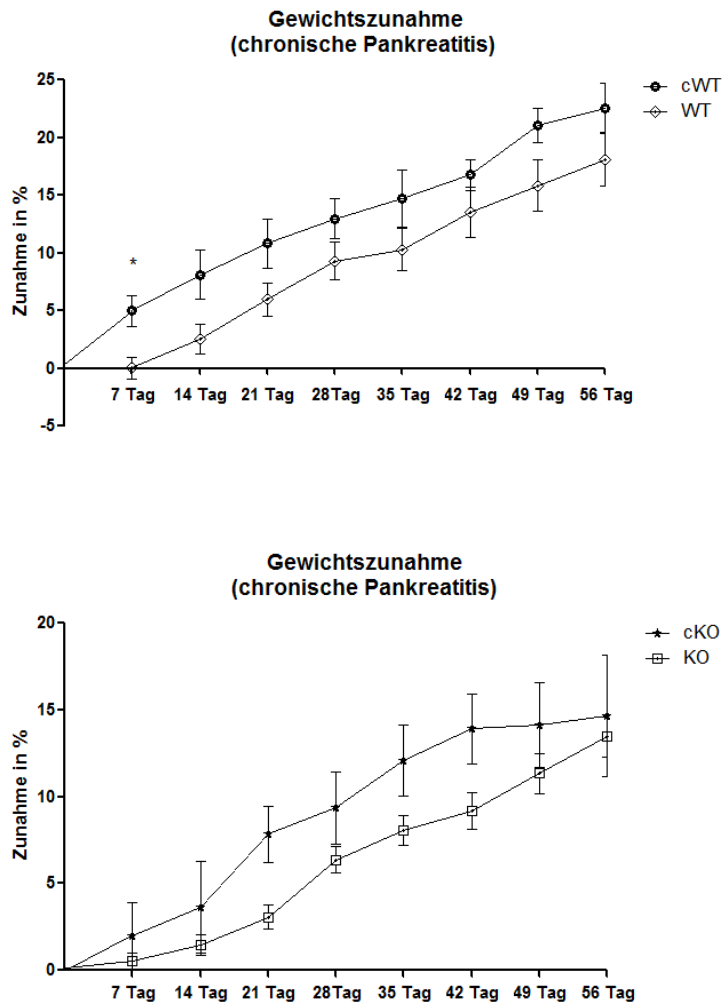


Abbildung 48: Graphische Darstellung der Körpergewichtszunahme im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis. Die WT-Tiere verloren in den ersten Tagen an Körpergewicht, die KO-Tiere nahmen kontinuierlich an Gewicht zu.

4.7 Analyse der Schmerz assoziierten neuronalen Aktivität

Das Protein p-ERK (*extracellular signal regulated Kinase*) wird durch nozizeptive Reize in aktivierten Hinterhorn-Neuronen überexprimiert. p-ERK zeigt somit eine gesteigerte neuronale Aktivität an und wird als Schmerzmaker

eingesetzt. Die immunhistochemische Analyse von Rückenmarksschnitten mit spezifischen Antikörpern gegen p-ERK zeigte bei den Tieren der WT-Gruppe ($12.15 \pm 0.74\%$) eine starke Immunreaktion im Hinterhorn, die bei den KO-Tieren deutlich reduziert war ($p < 0.05$; $9.74 \pm 0.54\%$; Abb. 49 und 50). Bei Rückenmarksschnitten von Tieren der Kontrollgruppen (cWT, cKO) sowie den transgenen Tieren (KO), waren die Dorsalhörner deutlich schwächer angefärbt (Abb. 49 und 50).

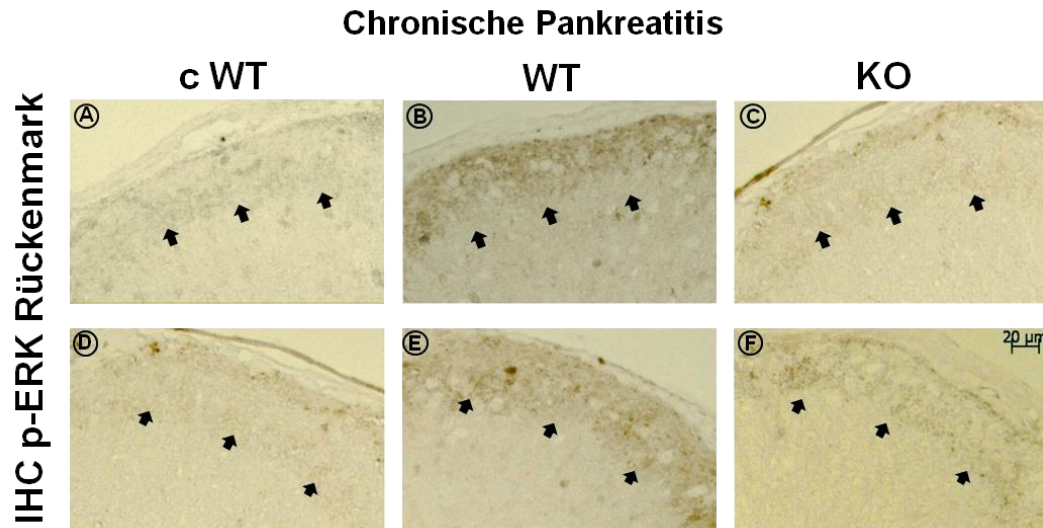


Abbildung 49: Beispielbilder der IHC gegen p-ERK. Die WT-Tiere zeigten deutlich sichtbar immunhistochemisch gefärbte Bereiche im Hinterhorn des Rückenmarks (B, E). Die Kontrollgruppe und die KO-Gruppe zeigen deutlich weniger Immunoreaktivität (A, D, C, F).

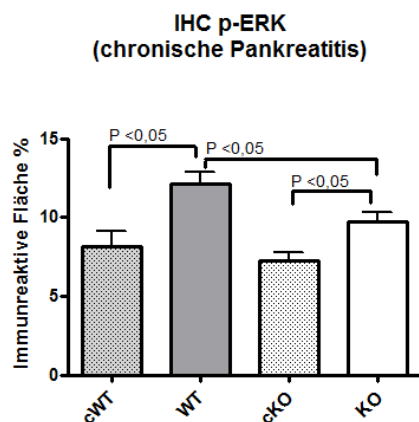


Abbildung 50: Quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse von p-ERK. Die beiden Kontrollgruppen (cWT, cKO) zeigten keinen Unterschied in der immunhistochemischen Reaktion von p-ERK im Hinterhorn des Rückenmarks. Die KO-Mäuse zeigten eine signifikant höhere immunhistochemische Reaktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen aber signifikant weniger Reaktion als die WT-Mäuse. Bei den KO-Mäusen konnte signifikant weniger neuronale Aktivität festgestellt werden als bei den WT-Mäusen. Die Auswertung der Schnitte erfolgte wie in Kapitel 3.2.3.8 beschrieben.

Als Ergänzung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen wurden Western Blots von Homogenaten aus dem Rückenmark im Bereich der Thorakalwirbel Th8 bis Th11 durchgeführt. Die Detektion zeigte hohe p-ERK Konzentrationen im Rückenmark der WT-Tiere, während bei den Tieren aus der KO-Gruppe offensichtlich geringere p-ERK Konzentrationen vorhanden waren (Abb.51). Die Tiere der Kontrollgruppen wiesen im Verhältnis zur KO- und WT-Gruppe äußerst wenig p-ERK im Rückenmarkshomogenat auf.

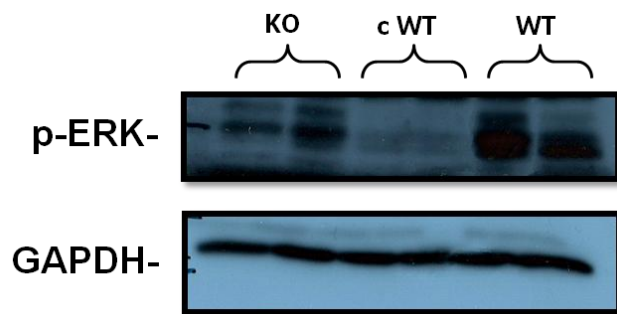


Abbildung 51: Gewebe-Western-Blot p-ERK. Bei den Kontrolltieren zeigte die Detektion geringe p-ERK Konzentrationen. Die KO-Mäuse enthielten offensichtlich geringere p-ERK Konzentrationen als die WT-Tiere. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH detektiert.

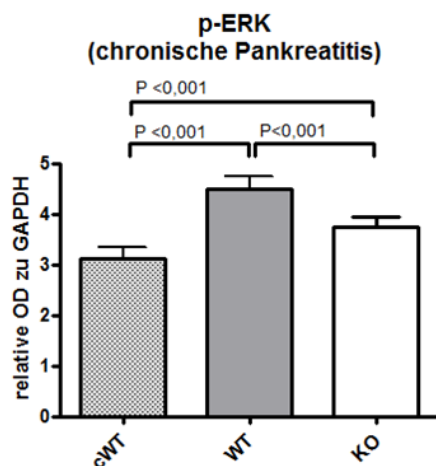


Abbildung 52: Auswertung des Gewebe-Western-Blot p-ERK.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Chemokins Fractalkin und seines Rezeptors CX3CR1 auf die Entzündungsreaktionen, die Fibrogenese und die Schmerzentstehung in der experimentellen akuten und chronischen Pankreatitis zu untersuchen. Durch die vorgelegte Arbeit konnte zum ersten Mal ein deutlich analgetischer Effekt durch die Unterbrechung der Fractalkine/CX3CR1-Achse in der akuten und chronischen Pankreatitis nachgewiesen werden.

5.1 Einfluß des Fractalkin-Rezeptors auf die Entzündungsreaktion

In Entzündungsprozessen spielen Chemokine häufig eine entscheidende Rolle. Es lassen sich inflammatorische und homöostatische Chemokine unterscheiden (Moser and Loetscher, 2001, Gerard and Rollins, 2001). Fractalkin ist ein inflammatorisches Zytokin, dass in seiner löslichen Form Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen in das entzündliche Gewebe rekrutiert (Bazan et al., 1997). Die an Endothelzellen vorkommende membrangebundene Form kann, induziert durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α , Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-1 (IL-1), zur Adhäsion von Leukozyten beitragen und wirkt dabei als ein Adhäsionsmolekül (Garcia et al., 2000).

In mehreren Experimenten konnte eine Überexpression von Fractalkin/CX3CR1 in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen (chronische Pankreatitis, Arteriosklerose, rheumatische Arthritis, Glomerulonephritis, Asthma allergika, Morbus Crohn, neuropathischen Schmerzen) in Zusammenhang gebracht werden (Yasuda et al., 2008, Yang et al., 2007, Blaschke et al., 2003, Blaschke and Muller, 2008, Segerer et al., 2002, Bisset and Schmid-Grendelmeier, 2005, Brand et al., 2006, Verge et al., 2004, Lindia et al., 2005, Zhuang et al., 2007, Holmes et al., 2008).

Durch diese Vorarbeiten motiviert, erschien eine Beteiligung der Fractalkin/CX3CR1-Achse an den pankreatischen Entzündungsgeschehen im Rahmen der akuten und chronischen Pankreatitis als wahrscheinlich.

In der vorgelegten Arbeit zeigte sich beim Eröffnen der Bauchhöhle im Versuchsansatz der akuten Pankreatitis erwartungsgemäß ein makroskopisch deutlich vergrößertes, ödematös verändertes Pankreas. Bei Entzündungen kommt

es zu einer vermehrten Durchblutung und einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit. Dabei können örtlich begrenzte (lokale) Ödeme entstehen (Menger et al., 2001). Um heraus zu finden, ob CX3CR1, einen direkten Einfluss auf das Gewebeödem hat, wurde das Verhältnis vom Nass- zum Trockengewicht ermittelt. Der Flüssigkeitsverlust bei den Versuchsgruppen (WT, KO, AK) war größer als bei den Kontrollgruppen (cWT, cKO) (Abb.32). Zwischen den Versuchsgruppen zeigten sich keine Unterschiede im Bezug auf den Grad des Gewebeödems. Im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis konnten signifikante Unterschiede zwischen Versuch- und Kontrollgruppen festgestellt werden. Das Ergebnis war allerdings auch hier unerwartet. Bei der makroskopisch sichtbaren Atrophie und der histologisch erkennbaren Zunahme des Bindegewebes wurde erwartet, dass die durch Fibrosierung gekennzeichneten Pankreata weniger Flüssigkeit enthalten als die Kontrollen. Die quantitative Darstellung aber zeigt ein genau umgekehrtes Bild. Eine mögliche Erklärung wäre, dass im Pankreatitis Modell mit repetitiven akuten Pankreatitis Schüben bis zuletzt noch Ödeme induziert werden. Es könnte allerdings auch sein, dass in dem lockeren Bindegewebe verstärkt Wasser in der extrazellulären Matrix gebunden ist.

Bei der histologischen Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte und Methylenblau-gefärbten Semidünnschnitte konnte im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis durch deutlich verbreitertes Interstitium das Ödem bestätigt werden. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Infiltration von Entzündungszellen mit Azinuszellnekrosen der Versuchsgruppen.

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastrukturen wurden in Pankreata der WT-Gruppe und der KO-Gruppe im Wesentlichen die gleichen pathologischen Beobachtungen gemacht. Im Rasterelektronenmikroskop konnten Bereiche mit massiver Entzündungszellinfiltration, nekrotische Gebiete und ausgeprägte interazinäre Ödeme beobachtet werden. An Ultradünnschnitten waren bei beiden Gruppen (WT und KO) dilatiertes endoplasmatisches Retikulum, eingewanderte Makrophagen und Leukozyten und diverse autolytische Prozesse der Azinus-Zellen erkennbar.

Trotz der aktuellen Diskussionen, ob erhöhte Amylase- und Lipase-Konzentrationen gleichbedeutend oder nicht gleichbedeutend sind mit dem Schweregrad der Pankreatitis, bleiben diese Parameter doch eine der Haupt-Diagnose-Pfeiler in der Klinik (Lankisch et al., 1999). In den präsentierten

Versuchen stieg nach einer Caerulein-Stimulation die Amylase- und Lipase-Konzentrationen der Versuchsgruppen um ein mehrfaches an. Eventuelle Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hätten Hinweise auf den akuten pankreatischen Schaden gegeben. Es wurde hierbei allerdings kein wesentlicher Unterschied der Amylase- und Lipase-Konzentrationen zwischen WT-, AK- und KO-Tieren festgestellt. Die Versuchsgruppen zeigten somit einen ähnlich schweren pankreatischen Schaden.

Ein wichtiger pathophysiologischer Hinweis auf eine akute Pankreatitis ist die Ausbildung von Vakuolen in den Azinuszellen. Hierdurch kann der Schweregrad des pankreatischen Schadens beurteilt werden (Krukemeyer M G 2005, Georg Thieme Verlag, Lech MM, 1995). Dieses Phänomen konnte in der vorgelegten Arbeit reproduziert werden. In der quantitativen Auswertung der für eine akute Pankreatitis typischen intraazinaren Vakuolen (Autophagosomen) hatte das Fehlen des CX3CR1 Rezeptors keinen Einfluss auf die Anzahl der Vakuolen. Auch die mit CX3CR1 Antikörpern behandelten Tiere zeigten keine verminderte Vakuolenbildung.

Um den Schweregrad der pankreatischen Entzündung zu ermitteln wurde in der vorgelegten Arbeit ein in der Pathologie etabliertes Scoring-System (Spormann-Score) für die Pankreatitis verwendet. Wie bereits in Kapitel 3.2.3.3. detaillierter beschrieben werden anhand des Spormann-Scores die Parameter des pankreatischen Ödems, der inflammatorischen Infiltrate, sowie die Ausprägung der pankreatischen Nekrose und Hämorrhagie beurteilt. Im Versuchsansatz zur akuten und zur chronischen Pankreatitis zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der KO-Gruppe und der WT-Gruppe. Die defizitären CX3CR1^{-/-} Mäuse und die WT-Mäuse entwickelten somit eine ähnlich schwere Pankreatitis sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Pankreatitis. Eine zu erwartende geringere Entzündungszellinfiltration der defizitären CX3CR1-Mäuse konnte bei der histologischen Auswertung nach Spormann nicht beobachtet werden. Untersuchungen der infiltrierten Leukozyten bei Glomerulonephritiden und anderen Nephropathien ergab, dass die überwiegende Anzahl an Entzündungszellen CX3CR1 exprimieren (Seegerer et al., 2002). Diese Studien legen die Vermutung nahe, dass der Rezeptor auf Entzündungszellen im Entzündungsgeschehen eine wesentliche Aufgabe hat. Oh und Kollegen berichteten 2008 über eine Fractalkin Überexpression im renalen Endothel und

eine durch CX3CR1 Antikörperblockade reduzierte Infiltration von Makrophagen beim ischämischen akuten Nierenversagen in Mäusen (Oh et al., 2008). Diese vorangegangenen Ergebnisse bei anderen Erkrankungen konnte für die akute und chronische Pankreatitis in unserem Versuchsansatz durch die histologische Auswertung nach Spormann nicht bestätigt werden. Allerdings enthält der Spormann Score als einen Parameter lediglich die Schwere der Entzündungszellinfiltration und keine genaue Entzündungszellklassifikation, welche rein morphologisch nicht möglich ist. Es ist daher nach wie vor denkbar, dass eine bestimmte Subpopulation von Entzündungszellen (z.B. Makrophagen oder neutrophile Granulozyten) reduziert infiltriert. Es werden daher weitere Untersuchungen benötigt um die Entzündungszellinfiltration in Abwesenheit des CX3CR1 Rezeptors bei der akuten und chronischen Pankreatitis im Detail zu charakterisieren.

Die erhöhten Amylase- und Lipase-Konzentrationen, die Auszählung der Vakuolen und der Spormann-Score zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden kein Einfluss von CX3CR1 auf den Schweregrad der Entzündung bei der akuten Pankreatitis nachgewiesen werden konnte. Zur Sicherung dieser unerwarteten Beobachtung sollten in Zukunft weitere Untersuchungen wie z.B. die Trypsin und Elastase Messung und/oder die Messung der Myeloperoxidase in Pankreashomogenaten durchgeführt werden, welche eine noch detailliertere Aussage über den Schweregrad der Pankreatitis zulassen werden.

In der Studie von Chakravorty et al. 2002 zu akuter Nierenentzündung, konnte durch ein „static-adhesion-assay-system“ die Adhäsion von Monozyten (26%) und peripheren NK (17%) an Fractalkin exprimierenden tubulären epithelialen Zellen demonstriert werden (Chakravorty et al., 2002). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde die chemotaktische Funktion von löslichem, sezerniertem Fractalkin untersucht. Hierbei zeigte sich *in vitro* bei Chemotaxis-Assays, dass der Überstand von Zytokin behandelten epitheliale Zellen des proximalen Tubulus (PTEC) eine Migration von peripheren Blut-Lymphozyten (PBLs) induziert. In dieser Studie wurde allerdings auch gezeigt, dass die aktivierten PBLs zu 84% CCR5, 90% CXCR3 und **19% CX3CR1** exprimierten und bei Blockade der CCR5, CXCR3 und der CX3CR1 Rezeptoren die Chemotaxis der PBLs zu 69%,

71% und **29%** gehemmt wurde (Cockwell et al., 2002).

Aus den genannten Studien wird deutlich, dass Fractalkin letztlich einer von mehreren Faktoren im Entzündungsprozess darstellt. Den Einfluss von Fractalkin und seinem Rezeptor CX3CR1 auf das Einwandern von Entzündungszellen und die Entzündungsreaktion hat, konnte bereits durch viele Arbeiten belegt werden. Einen direkten Einfluss scheint es bei dem akuten Entzündungsprozess der experimentell induzierten akuten und chronischen Pankreatitis nach den bisher vorliegenden Daten allerdings nicht zu haben. Es bleibt abzuwarten, ob ggf. Unterschiede in der Entzündungszellpopulation für den beobachteten gravierenden Effekt einer CX3CR1 Blockade auf die Schmerzen bei der experimentellen akuten und chronischen Pankreatitis verantwortlich sind oder ob es ein von der Entzündungsreaktion unabhängiger Mechanismus ist.

5.2 Einfluß des Fractalkin-Rezeptors auf die Fibrogenese

Um das Ausmaß der Fibrose in der chronischen Pankreatitis zu analysieren wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen das Glattmuskel- α -Actin (α -SMA) durchgeführt. Glattmuskel- α -Actin (α -SMA) ist ein Marker für die aktivierten pankreatischen Sternzellen (PSZ). Die Sternzellen bilden die zelluläre Grundlage der Organfibrose des Pankreas (Apte et al., 1998, Apte et al., 1999, Bachem et al., 1998). Charakteristisch für eine Sternzellaktivierung ist eine gesteigerte Matrixproteinsynthese und eine erhöhte Expression von α -SMA. Die Funktion der aktivierten PSZ besteht darin, das zerstörte Gewebe im Rahmen der natürlichen Wundheilung durch Bindegewebe zu ersetzen (Zimmermann et al., 2002). Bei dieser Regeneration kommt es unter pathologischen Bedingungen der chronischen Pankreatitis zu einer Fehlregulation der Sternzellaktivierung mit ausgeprägter Fibrosierung des gesamten Organs.

In der vorgelegten Arbeit wurde der bei einer Fibrose krankhaft vermehrte Bindegewebsanteil mittels Anilinfärbung analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Tiere mit chronischer Pankreatitis erwartungsgemäß eine deutliche Fibrose entwickelten. Des Weiteren zeigte sich eine sehr heterogene Verteilung der Kollagen Ansammlungen. Einerseits konnten Bereiche mit weniger stark sichtbaren Bindegewebsanteilen und Gebiete mit sehr hohem Bindegewebsanteil mit nur noch vereinzelt übrig gebliebenen Azini beobachtet werden. Ein Unterschied zwischen KO- und WT- Mäusen wurde nicht festgestellt.

Bei dem in der vorgelegten Arbeit verwendeten Mausmodell für die chronische Pankreatitis sind die fibrotischen Veränderungen nicht so ausgeprägt (Otsuki et al., 2010), wie bei humanmedizinischen Patienten mit manifestierter chronischer Pankreatitis. Der krankhaft vergrößerte Bindegewebsanteil im Mausmodell enthielt deutlich weniger Kollagenfasern als vergleichbare humanmedizinische Präparate einer chronischen Pankreatitis. Offensichtlich gibt es einen Unterschied zwischen repetitiver akuter Pankreatitis und chronischer Pankreatitis der bisher nur unzureichend verstanden ist. Dies kann als methodische Schwäche des Modells angesehen werden, allerdings sind repetitive Caerulein Injektionen das beste bisher etablierte Maus-Modell der chronischen Pankreatitis, welches vor allem andere Charakteristika der chronischen Pankreatitis, wie zum Beispiel den abdominalen Schmerz sehr gut wiedergeben.

Die quantitative Auswertung der α -SMA-IHC zeigte keinen wesentlichen Unterschied in der Immunoreaktion bei den CX3CR1^{-/-} knock-out Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren. Im verwendeten Caerulein-Pankreatitis-Modell werden die pankreatischen Sternzellen (PSZ) scheinbar in vergleichbarem Ausmaß aktiviert wie bei der humanen chronischen Pankreatitis. Die aktivierten pankreatischen Sternzellen (PSZ) bei Patienten mit chronischer Pankreatitis produzieren dann jedoch in großen Mengen fibrilläres Kollagen, was in unserem Maus-Modell durch Anilin-Färbungen so nicht beobachtet werden konnte. Durch repetitive akute Pankreatitis Schübe ist offenbar keine kontinuierlich andauende pankreatische Schädigung gegeben, wie zum Beispiel bei Caerulein-Dauerinfusionen oder Ligation des *Ductus choledochus* die durch stärkere Fibrose gekennzeichnet sind. Die beobachtete relativ geringe Bildung von fibrillärem Kollagen macht somit die Detektion eines möglichen Unterschiedes zwischen knock-out und WT-Tieren besonders schwierig. Diese Ergebnisse sollten entsprechend im Verlauf an o.g. Modellen bestätigt werden, in denen die Fibrosebildung wesentlich ausgeprägter ist.

Die CX3CR1^{-/-} knock-out -Mäuse entwickelten in unserem Modell eine gleich starke beginnende Fibrose. Die makroskopischen Beobachtungen der chronisch veränderten Pankreata zeigten bei beiden Gruppen (KO und WT) ein zum Teil um mehr als die Hälfte der Normalgröße atrophiertes Organ. Auch im REM und TEM zeigte sich das gleiche Bild einer typischen chronischen Pankreatitis bei den WT- als auch den KO-Tieren.

Diese Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu anderen experimentellen Untersuchungen in denen eine reduzierte Fibrosierung in CX3CR1^{-/-} knock-out Mäusen beobachtet wurde. Diese Untersuchungen zeigten eine verminderte renale Fibrose der CX3CR1^{-/-} knock-out Mäuse nach Ischämie-/Reperfusionsschaden (Furuichi et al., 2006) und arteriosklerotisch anfällige ApoE^{-/-} und CX3CR1^{-/-}-doppelt knock-out Mäuse entwickelten weniger progressive arteriosklerotische Veränderungen (Tacke et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurde jedoch bei Untersuchungen der hepatischen Fibrose in zwei unabhängigen Modellen (Carbon tetrachloride induzierte- und Gallengangligation induzierte-Fibrose) eine verstärkte Fibrose bei CX3CR1^{-/-} knock-out Mäusen festgestellt (Karlmark et al., 2010).

5.3 Einfluß des Fractalkin-Rezeptors auf die Schmerzen

Die Definition von neuropathischem Schmerz der Internationalen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (IASP) lautet: „*Pain caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system*“. Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass die Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen nicht das Ereignis eines einzelnen pathophysiologischen Mechanismus darstellt, sondern das Endprodukt einer geänderten peripheren, spinalen und supraspinalen Signalverarbeitung ist. Die Entstehung der extremen Schmerzen bei einer Pankreatitis ist noch nicht ausreichend untersucht. Die Schmerzen der chronischen Pankreatitis wurden traditionell als „entzündlicher Schmerz“ klassifiziert, neuere Studien zeigten aber strukturelle Veränderungen in Axonen und Ganglien, so dass eine neuropathische Schmerzkomponente immer wahrscheinlicher wird (Ceyhan et al., 2008, Drewes et al., 2008, Ceyhan et al., 2009a). Die neuronal-immunologische Kommunikation durch pankreatische Neuritis und Veränderungen der Nervenplastizität sind direkt mit dem Schweregrad der Schmerzen verbunden (Ceyhan et al., 2009a, Di Sebastiano et al., 1997, Ceyhan et al., 2009b).

Die Schmerzweiterleitung beginnt mit dem ersten synaptischen Reiz und läuft über ein zweites Neuron das im Hinterhorn (Lamina I, II und V) lokalisiert ist. Von dort aus projizieren die Neurone ihre Signale zu höher gelegenen Schmerzzentren im Gehirn (Abb.5). Interessanterweise kann das Schmerzsignal

im Hinterhorn des Rückenmarks durch Gliazellen reguliert werden (Millan, 1999). Gliazellen regulieren die neuronale synaptische Kommunikation durch Sekretion einer Vielfalt verschiedener Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Chemokine (TNF-[alpha], IL-1, und IL-6, Arachidonsäure, Excitatorische Aminosäuren (EAAs), Prostaglandine), Nerve-Wachstumsfaktor (NGF), und Enkephalinasen. Fractalkin ist das einzig bekannte neuronale Chemokin das von schmerzaktivierten Neuronen freigesetzt wird.

Unter Normalbedingungen ist Fractalkin in größeren Mengen an der extrazellulären Oberfläche von Neuronen exprimiert (Harrison et al., 1998) und der Fractalkinrezeptor auf Zellen der Microglia (Harrison et al., 1998, Verge et al., 2004, Lindia et al., 2005). Lindia und Kollegen konnten bereits 2005 durch zwei unterschiedliche Versuchsmodelle (*Freundsches Adjuvans* (entzündlich) und Spinalnerven Ligation (traumatisch)) für chronischen neuropathischen Schmerz zeigen, dass in schmerzrelevanten Laminae im Rückenmark eine stark erhöhte CX3CR1 Expressionen auftritt. In dieser Studie wurde erstmalig auch eine stark erhöhte Fractalkin Expression in Astrozyten beschrieben (Lindia et al., 2005). Pathologische Schmerzzustände sind also mit erhöhter Fractalkin Expression in Neuronen, Astrozyten und erhöhter CX3CR1 Expression in der Microglia verbunden (Verge et al., 2004, Park et al., 2011). Der gliale-Zelltyp der Microglia reagiert offenbar zuerst auf neuronale Stimulationen durch Entzündung oder Verletzung (Raghavendra et al., 2003).

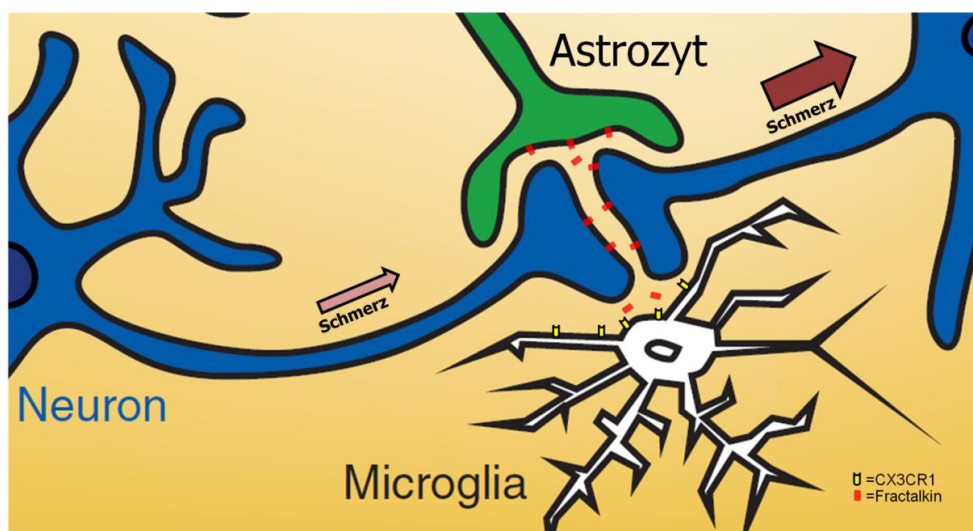


Abbildung 53: Wechselwirkung zwischen Neuron, Microglia und Astrozyt im ZNS modifiziert von (Svensson and Brodin, 2010). Microglia und Astrozyt regulieren neuronale synaptische Kommunikation durch Fractalkin und damit verbundene Sekretion verschiedener Neurotransmitter. Dadurch kann das Schmerzsignal im Hinterhorn des Rückenmarks durch Microglia und Astrozyt verstärkt werden.

Microglia und Astrozyten nehmen eine zentrale Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung von übertriebenen Schmerzzuständen bei entzündlichen und neurophatischen Prozessen ein (Svensson and Brodin, 2010, Milligan et al., 2008) (Abb.49). Die zum größten Teil unerklärlichen extremen Schmerzen der Pankreatitis machen eine Sensibilisierung der Neurone durch Microglia und Astrozyten sehr wahrscheinlich.

Durch die verhaltensbiologischen Beobachtungen im Open-Field-Versuch können Rückschlüsse auf das Allgemeinbefinden der Tiere geschlossen werden. Durch die Untersuchung der Defäkationen sollten eventuelle Veränderungen in der Anzahl und Konsistenz des Kotes dokumentiert werden. Es ist leicht vorstellbar, dass durch Schädigung des exokrinen Pankreas Veränderungen in der Kotbeschaffenheit auftreten. Zum anderen ist das vermehrte Absetzen von Kot und Urin bei Tieren ein Hinweis für Stress. In diesem Fall könnte der Stress verursacht durch vermehrtes Schmerzempfinden interpretiert werden. In der Tiermedizin sind häufiges Umschauen und Kratzen oder Treten nach dem Bauch typische Koliksymptome. Insofern hätte es nicht verwundert, wenn die Mäuse mit Pankreatitis diese Verhaltensweisen vermehrt gezeigt hätten. Auch die Anzahl an Sprüngen, die in der Tiermedizin als sogenanntes „Scherzen“ ein Ausdruck für Wohlbefinden bedeuten, hätte Hinweise auf den Schmerzzustand geben können. Auch wenn hierbei die Art der Sprünge nicht immer als Übermut gedeutet werden kann, so ist es in jedem Falle ein Marker für Aktivität. Im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis zeigten die CX3CR1-knock-out Mäuse nach 12 Stunden ein signifikant stärkeres Explorationsverhalten als die WT-Gruppe. Das signifikant erhöhte Lokomotionsverhalten der WT-Tiere gegenüber der KO- und Kontroll-Gruppen kann allgemein als schmerzbedingte Unruhe gewertet werden. Anorexie ist eins der Hauptsymptome der Pankreatitis (Steiner, 2006, Mar 1), der hoch signifikante Körpergewichtsverlust der WT-Tiere kann somit als schmerzassoziiertes Phänomen gedeutet werden.

Die Schmerzuntersuchung evozierter Schmerzen in der vorgelegten Arbeit erfolgte mittels Von-Frey-Filamenten. Bei der Messung der mechanischen Hyperalgesie durch die Von-Frey-Filamente konnte eine hoch signifikant reduzierte Schmerzschwelle der KO-Mäuse beobachtet werden. Auch die durch CX3CR1 Antikörper behandelten Tiere zeigten signifikant geringeres schmerzassoziiertes Verhalten. Diese erheblich reduzierten Schmerzreaktionen konnten

durchgängig bei dem Versuchsansatz zur akuten und chronischen Pankreatitis dargestellt werden.

Durch die molekularbiologischen Untersuchungen mittels WB und IHC gegen p-ERK im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis konnte gesteigerte neuronale Aktivität im Hinterhorn des Rückenmarks der WT-Tiere im Vergleich zu den KO-Tieren beobachtet werden. Durch die Auswertung der p-ERK IHC konnte eine signifikant reduzierte neuronale Aktivität der KO-Tiere gegenüber den WT-Tieren quantifiziert, und die Ergebnisse der Von-Frey-Messungen dadurch bestätigt werden.

Durch die durchgängig reduzierte Empfindlichkeit gegenüber der Von-Frey-Filamente, der stark reduzierten Körpergewichtsabnahme und der durch p-ERK darstellbaren verminderten neuronalen Aktivität bei den KO-Mäusen, muss davon ausgegangen werden, dass der Fractalkinrezeptor CX3CR1 eine zentrale Stellung im pankreatischen Schmerzprozess einnimmt.

Der Mechanismus der starken pankreatischen Schmerzzustände ist noch nicht endgültig verstanden. Die pankreatische Neuritis und Veränderungen der Neuroplastizität korrelieren mit dem Schweregrad der Schmerzen (Bockman et al., 1988, Di Sebastiano et al., 1997, Jung et al., 2000, Ceyhan et al., 2009a, Ceyhan et al., 2009b). Da Fractalkin bei Nervenreizung von Neuronen sezerniert wird und somit als Lockstoff für Leukozyten und Makrophagen dient, ist es gut vorstellbar, dass das Fractalkin eine Schlüsselfunktion bei der pankreatischen Neuritis einnimmt. Verletzungen des Perineuriums intrapankreatischer Nerven ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten CX3CR1-knock-out Mäusen könnte die Invasion von Entzündungszellen durch den fehlenden Rezeptor auf den Entzündungszellen reduziert und damit auch die neurale Schädigung und der pankreatische Schmerz vermindert sein. Dies quantitativ am Mausmodell darzustellen ist allerdings sehr schwierig. Durch die histologische und die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastrukturen konnte kein Unterschied in der Quantität der Entzündungszellinfiltrationen beobachtet werden. Hier werden in Zukunft weitere Differenzierungen klären ob es ggf. qualitative Unterschiede in der Entzündungszellinfiltration an unserem Mausmodell gibt. Es ist beispielsweise gut vorstellbar, dass es zwischen den WT- und KO- Tieren Unterschiede in der Anzahl der Makrophagen und/oder der T-Zellen gibt, ohne dass sich die

Gesamtanzahl der Entzündungszellen unterscheidet. Alternativ könnte das reduzierte Schmerzempfinden der defizitären CX3CR1^{-/-} Mäuse auf einen zentralen Mechanismus zurückzuführen sein. Bei der zentralen Schmerzweiterleitung haben Microglia und Astrozyten eine schmerzmodulierende Wirkung. Fractalkin und Rezeptor scheinen in der neuro-glialen Kommunikation eine wichtige Rolle einzunehmen. Durch den defizitären CX3CR1 Rezeptor bei Microglia und Astrozyten könnte ihre verstärkende und aufrechterhaltende Funktion von Schmerzzuständen abgeschwächt sein. Der Grund für die geringeren Schmerzen der CX3CR1^{-/-} Tiere, und somit der Einfluss des Fractalkin Rezeptors auf die Schmerzen bei der experimentellen Pankreatitis liegt somit sehr wahrscheinlich an einem (oder kombiniert beiden) der folgenden zwei Mechanismen: Zum einen ist eine peripher schwächere Neuritis vorstellbar, welche mit dem vorliegenden Modell nicht untersucht werden konnte und zum anderen eine zentral schwächere schmerzaggravierende Wirkung von Astrozyten und Microglia.

Neuropathische Schmerzen sprechen in der Regel nicht ausreichend auf die klassischen Analgetika (Opioide, NSAIDs) an (Löscher, 2006). Es werden zum Teil erhebliche Speziesunterschiede in der Wirkung von Morphin beobachtet. Aufgrund der möglichen paradoxen Erregungserscheinungen bei der Katze wird Morphin vor allem beim Hund eingesetzt.

Alle klinisch etablierten therapeutischen Ansätze der akuten und chronischen Pankreatitis sind rein symptomatisch. Bis zum heutigen Tage konnte keine kausale Therapie etabliert werden. Der abdominale Schmerz ist das absolute Leitsymptom bei der akuten und chronischen Pankreatitis. Durch die Gabe von nicht-steroidalen-Antiphlogistika und Opioiden kann keine zufriedenstellende Schmerzfreiheit erreicht werden. Die analgetische Wirkung einer CX3CR1 Blockade durch verminderte Neuritis und/oder zentrale Hemmung der schmerzmodulierenden Wirkung von Microglia und Astrozyten in Kombination mit der überwiegend zentral analgetischer Wirkung mit Opiaten, stellt einen interessanten Ansatz zur besseren Schmerzbehandlung der akuten und chronischen Pankreatitis dar. Eine eventuelle synergistische Wirkung von CX3CR1-Blockern und Opioiden könnte durch Reduzierung der Opioid-Konzentration die unerwünschten Nebenwirkungen (Toleranzentwicklung, Atemdepressivität, Suchtpotential) verringern.

Die Blockade des Fractalkin-Rezeptors könnte somit ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für eine neuartige Schmerztherapie sein. Es ist hierbei eine schmerztherapeutische Anwendung sowohl in der Humanmedizin als auch im Kleintierbereich gut vorstellbar.

Einer der führenden forschenden Pharmakonzerne Europas hat bereits einen chemischen „small-molecule-inhibitor“ entwickelt der den Fractalkinrezeptor auch nach oraler Gabe funktionell blockiert. Die pharmakodynamischen- und pharmakokinetischen- Tests sind hierbei weitgehend abgeschlossen. Auf den Grundlagen meiner Arbeit hat bereits eine Folgearbeit mit diesem oral verfügbaren chemischen Inhibitor in meiner Arbeitsgruppe begonnen. Jüngste Ergebnisse zeigen ebenfalls ein vielversprechendes schmerztherapeutisches Potenzial.

6 Zusammenfassung

Die akute und chronische Pankreatitis ist eine der häufigsten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Das absolute Leitsymptom sind die abdominalen Schmerzen. Histopathologisch ist die akute Pankreatitis durch Ödembildung, Entzündungszellinfiltrationen und durch den nekrotischen Azinuszelluntergang charakterisiert. Die chronische Pankreatitis zeigt zusätzlich eine ausgeprägte Fibrosierung des gesamten Organs. Eine rasche Diagnosestellung mit einer schnellen Beurteilung des Schweregrads ist für die Prognose entscheidend. Zur Therapie gehört die Behandlung der Schmerzsymptomatik und Flüssigkeits-Substitution. Bis zum heutigen Tage gibt es keine kausale Therapie der akuten und chronischen Pankreatitis.

Das Chemokin Fractalkin wurde von Bazan et. al 1997 erstmals sequenziert. Neuere Forschungsergebnisse zeigten einen wesentlichen Einfluss des Chemokins Fractalkin in diversen entzündlichen Prozessen. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Überexpression von Fractalkin bzw. CX3CR1 im pankreatischen, renalen und hepatischen Gewebe zu einer Zunahme der entzündlichen Reaktionen und des fibrotischen Umbaus führt. Das Chemokin Fractalkin ist im pankreatischen Gewebe bei Patienten mit chronischer Pankreatitis deutlich überexprimiert und ist signifikant mit einem höheren Schweregrad von Schmerzen assoziiert.

Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es, anhand von CX3CR1^{-/-} knock-out Mäusen und durch Blockade des Fractalkin Rezeptors CX3CR1 mit blockierenden Antikörpern, die Rolle des Chemokins Fractalkin und dessen Rezeptors auf die Entzündungsreaktion, den pankreatischen Schmerz und die Fibrose bei der experimentellen akuten und chronischen Pankreatitis genauer zu untersuchen.

Bezüglich des Schweregrades des pankreatischen Ödems, der Anzahl der intraazinären Vakuolen und den morphologischen Veränderungen konnten keine wesentlichen Unterschiede der Entzündungsreaktion bei der experimentellen akuten Pankreatitis der CX3CR1^{-/-} knock-out Mäusen gegenüber den Kontrollgruppen festgestellt werden. Auch bei den Untersuchungen zur Klassifizierung des Schweregrades der Fibrose bei der chronischen Pankreatitis

mittels immunhistochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen das Glattmuskel- α -Actin (α -SMA), Bindegewebsfärbung mit Anilin und elektronenmikroskopische Charakterisierungen, wurden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den zwei Gruppen beobachtet. Der Fractalkin-Rezeptor scheint somit zumindest nicht direkt einen Einfluss auf die Entzündungsreaktion und die Fibrogenese zu haben.

Die Schmerzintensität wurde anhand von Verhaltenstests mit Von-Frey-Filamenten gemessen. Dies wurde weiter gestützt durch immunhistochemische Färbungen des Rückenmarks der Tiere gegen den Schmerzmaker p-ERK und dem Proteinnachweis mittels Western Blot. Die Schmerzmessungen durch die Von-Frey-Filamente zeigten durchgängig hoch signifikant reduziertes Schmerzempfinden der CX3CR1^{-/-} knock-out Mäuse. Dieses reduzierte Schmerzempfinden wurde durch geringere Proteinkonzentrationen von p-ERK im Western-Blot und immunhistochemisch gefärbten Rückenmarksschnitten bestätigt. Der Fractalkin Rezeptor scheint somit einen entscheidenden Einfluss auf das Schmerzempfinden bei der experimentellen Pankreatitis zu haben.

Zusammengefasst scheint CX3CR1 damit ein vielversprechendes therapeutisches Target für eine neuartige Schmerztherapie sowohl in der Human- als auch in der Kleintiermedizin zu sein.

7 Summary

Acute and chronic pancreatitis are major inflammatory diseases of the pancreas, characterized by severe abdominal pain. Acute pancreatitis is characterized by inflammatory cell infiltration, pancreatic edema and acinar cell necrosis while chronic pancreatitis is accompanied by severe fibrosis. Ongoing and unbearable pain is the most common and arresting symptom of chronic pancreatitis patients. Therefore, pain relief is the primary goal in the treatment of this disease. First line medical options for pancreatitis include fluid resuscitation, pain medication, pancreatic enzymes and abstinence from alcohol and tobacco. A causal therapy for acute and chronic pancreatitis is lacking until today.

Bazan and colleagues first described the chemokine fractalkine in 1997. More recent studies reported that fractalkine with its receptor CX3CR1 play important roles in pain processing in diverse neuropathic pain models. It was furthermore shown that overexpression of fractalkine in pancreatic, renal and hepatic tissue correlated with the inflammatory reaction and the severity of fibrosis. Our group was able to show earlier that fractalkine is highly overexpressed in patients with chronic pancreatitis and that this overexpression significantly correlates with the severity of pain in these patients.

In this study we used experimental models of acute and chronic pancreatitis in CX3CR1^{-/-} knock-out mice to investigate the role of fractalkine and its receptor CX3CR1 in inflammatory reaction, pain and fibrosis in these models. Furthermore, we investigated the therapeutic potential of a CX3CR1 blockade by treating mice with a CX3CR1 blocking antibody.

There was no significant difference between the CX3CR1^{-/-} knock-out mice and the control group in the severity of the pancreatic inflammatory reaction concerning pancreatic edema, the quantification of intraacinar vacuoles, and the electron microscopic analysis. In order to classify the severity of fibrosis immunostaining for alpha-smooth-muscle-actin (α -SMA), staining of connective tissue with aniline, and electron microscopic analysis were utilized. There was no significant difference between the CX3CR1^{-/-} knock-out mice and the control group in the severity of fibrosis. Therefore, fractalkine seems not to be directly involved in the fibrogenesis in chronic pancreatitis as it was observed in renal and

liver fibrosis. We believe that fractalkine promotes tissue fibrosis indirectly by increasing mononuclear cell infiltration, which secrete different cytokines leading to further activation of pancreatic stellate cells with consequent initiation of fibrogenesis.

The intensity of pain was quantified by nociceptive measurements with Von-Frey-filaments and on a molecular level by immunostaining and Western blot analysis of the spinal cord with the well-established pain-maker p-ERK. Both knock-out mice and antibody treated mice showed significantly reduced pain related behavior in the Von-Frey-filaments tests when compared to their control groups. These findings were confirmed by immunostaining and Western blot analysis, where control groups showed significantly less p-ERK immunoreactivity and significantly less p-ERK protein levels in the spinal cord. Therefore the fractalkine receptor CX3CR1 seems to play a fundamental role in pain generation and processing in experimental acute and chronic pancreatitis.

In conclusion, blocking of the fractalkine/CX3CR1 axis seems to be a promising therapeutic option for the future management of pain in acute and chronic pancreatitis both in human- and veterinary medicine.

8 Literaturverzeichnis

ADLER, G., HUPP, T. & KERN, H. F. 1979. Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 382, 31-47.

ADLER, G., ROHR, G. & KERN, H. F. 1982. Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat. *Dig Dis Sci*, 27, 993-1002.

AMMANN, R. W. 2001. The natural history of alcoholic chronic pancreatitis. *Intern Med*, 40, 368-75.

AMMANN, R. W. & MUELLHAUPT, B. 1994. Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. *Gut*, 35, 552-6.

APOSTOLAKIS, S., KRAMBOVITIS, E., VLATA, Z., KOCHIADAKIS, G. E., BARITAKI, S. & SPANDIDOS, D. A. 2007. CX3CR1 receptor is up-regulated in monocytes of coronary artery diseased patients: impact of pre-inflammatory stimuli and renin-angiotensin system modulators. *Thromb Res*, 121, 387-95.

APTE, M. V., HABER, P. S., APPELEGATE, T. L., NORTON, I. D., MCCAUGHAN, G. W., KORSTEN, M. A., PIROLA, R. C. & WILSON, J. S. 1998. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 43, 128-33.

APTE, M. V., HABER, P. S., DARBY, S. J., RODGERS, S. C., MCCAUGHAN, G. W., KORSTEN, M. A., PIROLA, R. C. & WILSON, J. S. 1999. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*, 44, 534-41.

ARCHER, J. 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav*, 21, 205-35.

BACHEM, M. G., SCHNEIDER, E., GROSS, H., WEIDENBACH, H., SCHMID, R. M., MENKE, A., SIECH, M., BEGER, H., GRUNERT, A. & ADLER, G. 1998. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*, 115, 421-32.

BAZAN, J. F., BACON, K. B., HARDIMAN, G., WANG, W., SOO, K., ROSSI, D., GREAVES, D. R., ZLOTNIK, A. & SCHALL, T. J. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385, 640-4.

BEGER, H. G., BUCHLER, M. & BITTNER, R. 1990. The duodenum preserving resection of the head of the pancreas (DPRHP) in patients with chronic pancreatitis and an inflammatory mass in the head. An alternative surgical technique to the Whipple operation. *Acta Chir Scand*, 156, 309-15.

BHATIA, M., BRADY, M., SHOKUHI, S., CHRISTMAS, S., NEOPTOLEMOS, J. P. & SLAVIN, J. 2000. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*, 190, 117-25.

BISSET, L. R. & SCHMID-GRENDELMEIER, P. 2005. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med*, 11, 35-42.

BLASCHKE, S., KOZIOLEK, M., SCHWARZ, A., BENOHR, P., MIDDEL, P., SCHWARZ, G., HUMMEL, K. M. & MULLER, G. A. 2003. Proinflammatory role of fractalkine (CX3CL1) in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 30, 1918-27.

BLASCHKE, S. & MULLER, G. A. 2008. [Fractalkine--a proinflammatory chemokine in rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol*, 67, 424-8.

BOCKMAN, D. E., BUCHLER, M., Malferttheiner, P. & BEGER, H. G. 1988. Analysis of nerves in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 94, 1459-69.

BORDALO, O., GONCALVES, D., NORONHA, M., CRISTINA, M. L.,

SALGADINHO, A. & DREILING, D. A. 1977. Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, 68, 278-85.

BRADY, M., CHRISTMAS, S., SUTTON, R., NEOPTOLEMOS, J. & SLAVIN, J. 1999. Cytokines and acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 13, 265-89.

BRAGANZA, J. M. 1983. Pancreatic disease: a casualty of hepatic "detoxification"? *Lancet*, 2, 1000-3.

BRAGANZA, J. M., LEE, S. H., MCCLOY, R. F. & MCMAHON, M. J. 2011. Chronic pancreatitis. *Lancet*, 377, 1184-97.

BRAND, S., HOFBAUER, K., DAMBACHER, J., SCHNITZLER, F., STAUDINGER, T., PFENNIG, S., SEIDERER, J., TILLACK, C., KONRAD, A., GOKE, B., OCHSENKUHN, T. & LOHSE, P. 2006. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype. *Am J Gastroenterol*, 101, 99-106.

BÜCHLER MW, U. W., MALFERTHEINER P 1996. *Pankreaserkrankungen*, Karger Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Singapore, Tokio, Sydney.

CARDONA, A. E., PIORO, E. P., SASSE, M. E., KOSTENKO, V., CARDONA, S. M., DIJKSTRA, I. M., HUANG, D., KIDD, G., DOMBROWSKI, S., DUTTA, R., LEE, J. C., COOK, D. N., JUNG, S., LIRA, S. A., LITTMAN, D. R. & RANSOHOFF, R. M. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*, 9, 917-24.

CEYHAN, G. O., BERGMANN, F., KADIHASANOGLU, M., ALTINTAS, B., DEMIR, I. E., HINZ, U., MULLER, M. W., GIESE, T., BUCHLER, M. W., GIESE, N. A. & FRIESS, H. 2009a. Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136,

177-186 e1.

CEYHAN, G. O., DEMIR, I. E., MAAK, M. & FRIESS, H. 2010. Fate of nerves in chronic pancreatitis: Neural remodeling and pancreatic neuropathy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24, 311-22.

CEYHAN, G. O., DEUCKER, S., DEMIR, I. E., ERKAN, M., SCHMELZ, M., BERGMANN, F., MULLER, M. W., GIESE, T., BUCHLER, M. W., GIESE, N. A. & FRIESS, H. 2009b. Neural fractalkine expression is closely linked to pain and pancreatic neuritis in human chronic pancreatitis. *Lab Invest*, 89, 347-61.

CEYHAN, G. O., MICHALSKI, C. W., DEMIR, I. E., MULLER, M. W. & FRIESS, H. 2008. Pancreatic pain. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 22, 31-44.

CHAKRAVORTY, S. J., COCKWELL, P., GIRDLESTONE, J., BROOKS, C. J. & SAVAGE, C. O. 2002. Fractalkine expression on human renal tubular epithelial cells: potential role in mononuclear cell adhesion. *Clin Exp Immunol*, 129, 150-9.

CHEN, X., GELLER, E. B., ROGERS, T. J. & ADLER, M. W. 2007. The chemokine CX3CL1/fractalkine interferes with the antinociceptive effect induced by opioid agonists in the periaqueductal grey of rats. *Brain Res*, 1153, 52-7.

CHOLERIS, E., THOMAS, A. W., KAVALIERS, M. & PRATO, F. S. 2001. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev*, 25, 235-60.

COCKWELL, P., CALDERWOOD, J. W., BROOKS, C. J., CHAKRAVORTY, S. J. & SAVAGE, C. O. 2002. Chemoattraction of T cells expressing CCR5, CXCR3 and CX3CR1 by proximal tubular epithelial cell chemokines. *Nephrol Dial Transplant*, 17, 734-44.

COMBADIÈRE, C., POTTEAUX, S., GAO, J. L., ESPOSITO, B., CASANOVA,

S., LEE, E. J., DEBRE, P., TEDGUI, A., MURPHY, P. M. & MALLAT, Z. 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation*, 107, 1009-16.

COMFORT, M. W. & STEINBERG, A. G. 1952. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology*, 21, 54-63.

D'HAESE, J. G., DEMIR, I. E., FRIESS, H. & CEYHAN, G. O. 2010. Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets*, 14, 207-19.

DAMAS, J. K., BOULLIER, A., WAEHRE, T., SMITH, C., SANDBERG, W. J., GREEN, S., AUKRUST, P. & QUEHENBERGER, O. 2005. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 2567-72.

DE BEAUX, A. C., PALMER, K. R. & CARTER, D. C. 1995. Factors influencing morbidity and mortality in acute pancreatitis; an analysis of 279 cases. *Gut*, 37, 121-6.

DEMIR, I. E., CEYHAN, G. O., RAUCH, U., ALTINTAS, B., KLOTZ, M., MULLER, M. W., BUCHLER, M. W., FRIESS, H. & SCHAFER, K. H. 2010. The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil*, 22, 480-90, e112-3.

DESHPANDE, V., CHICANO, S., FINKELBERG, D., SELIG, M. K., MINO-KENUDSON, M., BRUGGE, W. R., COLVIN, R. B. & LAUWERS, G. Y. 2006. Autoimmune pancreatitis: a systemic immune complex mediated disease. *Am J Surg Pathol*, 30, 1537-45.

DI SEBASTIANO, P., FINK, T., WEIHE, E., FRIESS, H., INNOCENTI, P., BEGER, H. G. & BUCHLER, M. W. 1997. Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis.

Gastroenterology, 112, 1648-55.

DOMINGUEZ-MUNOZ, J. E. 2011. Pancreatic exocrine insufficiency: diagnosis and treatment. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 Suppl 2, 12-6.

DREWES, A. M., KRARUP, A. L., DETLEFSEN, S., MALMSTROM, M. L., DIMCEVSKI, G. & FUNCH-JENSEN, P. 2008. Pain in chronic pancreatitis: the role of neuropathic pain mechanisms. *Gut*, 57, 1616-27.

ERKAN, M., MICHALSKI, C. W., RIEDER, S., REISER-ERKAN, C., ABIATARI, I., KOLB, A., GIESE, N. A., ESPOSITO, I., FRIESS, H. & KLEEFF, J. 2008. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 6, 1155-61.

ETEMAD, B. & WHITCOMB, D. C. 2001. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*, 120, 682-707.

FISCHER, T. Z. & WAXMAN, S. G. 2010. Neuropathic pain in diabetes--evidence for a central mechanism. *Nat Rev Neurol*, 6, 462-6.

FLINT, J., CORLEY, R., DEFRIES, J. C., FULKER, D. W., GRAY, J. A., MILLER, S. & COLLINS, A. C. 1995. A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science*, 269, 1432-5.

FOITZIK, T. & BUHR, H. J. 1997. [New aspects in the pathophysiology of chronic pancreatitis]. *Chirurg*, 68, 855-64.

FORMAN, M. A., MARKS, S. L., DE COCK, H. E., HERGESELL, E. J., WISNER, E. R., BAKER, T. W., KASS, P. H., STEINER, J. M. & WILLIAMS, D. A. 2004. Evaluation of serum feline pancreatic lipase immunoreactivity and helical computed tomography versus conventional testing for the diagnosis of feline pancreatitis. *J Vet Intern Med*, 18, 807-15.

FREY, M. 1896, Verlag S. Hirzel. *Untersuchungen Über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut.*

FRIESS, H., BERBERAT, P. O., WIRTZ, M. & BUCHLER, M. W. 2002. Surgical treatment and long-term follow-up in chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 14, 971-7.

FURUICHI, K., GAO, J. L. & MURPHY, P. M. 2006. Chemokine receptor CX3CR1 regulates renal interstitial fibrosis after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*, 169, 372-87.

GALKINA, E. & LEY, K. 2007. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr Drug Targets*, 8, 1239-48.

GAO, H. K., ZHOU, Z. G., HAN, F. H., CHEN, Y. Q., YAN, W. W., HE, T., WANG, C. & WANG, Z. 2005. Differences in platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression between peripheral circulation and pancreatic microcirculation in cerulein-induced acute edematous pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 11, 661-4.

GAO, Y. J. & JI, R. R. 2009. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J*, 2, 11-17.

GARCIA, G. E., XIA, Y., CHEN, S., WANG, Y., YE, R. D., HARRISON, J. K., BACON, K. B., ZERWES, H. G. & FENG, L. 2000. NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. *J Leukoc Biol*, 67, 577-84.

GERARD, C. & ROLLINS, B. J. 2001. Chemokines and disease. *Nat Immunol*, 2, 108-15.

GOEBELL H, M. J., ADLER G, FÖLSCH UR, & MV, S. 1995. *Erkrankungen*

des exkretorischen Pankreas, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag Jena,

.

GRADY, T., MAH'MOUD, M., OTANI, T., RHEE, S., LERCH, M. M. & GORELICK, F. S. 1998. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol*, 275, G1010-7.

HÄNICHEN T, M. G. 1990. Retrospektive Studie zur Pathologie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas beim Hund und Katze. *Tierärztl Umschau* 45: 363.

HARRISON, J. K., JIANG, Y., CHEN, S., XIA, Y., MACIEJEWSKI, D., MCNAMARA, R. K., STREIT, W. J., SALAFRANCA, M. N., ADHIKARI, S., THOMPSON, D. A., BOTTI, P., BACON, K. B. & FENG, L. 1998. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10896-901.

HESS, R. S., SAUNDERS, H. M., VAN WINKLE, T. J., SHOFER, F. S. & WASHABAU, R. J. 1998. Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic abnormalities in dogs with fatal acute pancreatitis: 70 cases (1986-1995). *J Am Vet Med Assoc*, 213, 665-70.

HILL, R. C. & VAN WINKLE, T. J. 1993. Acute necrotizing pancreatitis and acute suppurative pancreatitis in the cat. A retrospective study of 40 cases (1976-1989). *J Vet Intern Med*, 7, 25-33.

HOFBAUER, B., SALUJA, A. K., LERCH, M. M., BHAGAT, L., BHATIA, M., LEE, H. S., FROSSARD, J. L., ADLER, G. & STEER, M. L. 1998. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol*, 275, G352-62.

HOLMES, F. E., ARNOTT, N., VANDERPLANK, P., KERR, N. C., LONGBRAKE, E. E., POPOVICH, P. G., IMAI, T., COMBADIÈRE, C., MURPHY, P. M. & WYNICK, D. 2008. Intra-neural administration of fractalkine

attenuates neuropathic pain-related behaviour. *J Neurochem*, 106, 640-9.

HORZINEK M.C. , S. V., LUTZ H. 2005 Gerog Thieme Verlag. *Krankheiten der Katze*.

HOUGHTON, A. K., WANG, C. C. & WESTLUND, K. N. 2001. Do nociceptive signals from the pancreas travel in the dorsal column? *Pain*, 89, 207-20.

HUGHES, P. M., BOTHAM, M. S., FRENTZEL, S., MIR, A. & PERRY, V. H. 2002. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia*, 37, 314-27.

IMAI, T., HIESHIMA, K., HASKELL, C., BABA, M., NAGIRA, M., NISHIMURA, M., KAKIZAKI, M., TAKAGI, S., NOMIYAMA, H., SCHALL, T. J. & YOSHIE, O. 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*, 91, 521-30.

INOUE, A., HASEGAWA, H., KOHNO, M., ITO, M. R., TERADA, M., IMAI, T., YOSHIE, O., NOSE, M. & FUJITA, S. 2005. Antagonist of fractalkine (CX3CL1) delays the initiation and ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum*, 52, 1522-33.

JACOBS, M. L., DAGGETT, W. M., CIVETTE, J. M., VASU, M. A., LAWSON, D. W., WARSHAW, A. L., NARDI, G. L. & BARTLETT, M. K. 1977. Acute pancreatitis: analysis of factors influencing survival. *Ann Surg*, 185, 43-51.

JI, R. R., BABA, H., BRENNER, G. J. & WOOLF, C. J. 1999. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci*, 2, 1114-9.

JI, R. R. & SUTER, M. R. 2007. p38 MAPK, microglial signaling, and

neuropathic pain. *Mol Pain*, 3, 33.

JOHNSTON, I. N., MILLIGAN, E. D., WIESELER-FRANK, J., FRANK, M. G., ZAPATA, V., CAMPISI, J., LANGER, S., MARTIN, D., GREEN, P., FLESHNER, M., LEINWAND, L., MAIER, S. F. & WATKINS, L. R. 2004. A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *J Neurosci*, 24, 7353-65.

JONES, B. A., BEAMER, M. & AHMED, S. 2010. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv*, 10, 263-70.

JUNG, S., ALIBERTI, J., GRAEMMEL, P., SUNSHINE, M. J., KREUTZBERG, G. W., SHER, A. & LITTMAN, D. R. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*, 20, 4106-14.

KAMISAWA, T. & OKAMOTO, A. 2006. Autoimmune pancreatitis: proposal of IgG4-related sclerosing disease. *J Gastroenterol*, 41, 613-25.

KARLMARK, K. R., ZIMMERMANN, H. W., RODEBURG, C., GASSLER, N., WASMUTH, H. E., LUEDDE, T., TRAUTWEIN, C. & TACKE, F. 2010. The fractalkine receptor CXCR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology*, 52, 1769-82.

KHOKHAR, A. S. & SEIDNER, D. L. 2004. The pathophysiology of pancreatitis. *Nutr Clin Pract*, 19, 5-15.

KLAR, E. & WERNER, J. 2000. [New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis]. *Chirurg*, 71, 253-64.

KLINZING, S., LESSER, T., SCHUBERT, H., BARTEL, M. & KLEIN, U. 2000.

Wet-to-dry ratio of lung tissue and surfactant outwash after one-lung flooding. *Res Exp Med (Berl)*, 200, 27-33.

KLOPPEL, G., DETLEFSEN, S. & FEYERABEND, B. 2004. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchows Arch*, 445, 1-8.

KLOPPEL, G. & MAILLET, B. 1992. The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 420, 1-4.

KOZIOLEK, M. J., SCHMID, H., COHEN, C. D., BLASCHKE, S., HEMMERLEIN, B., ZAPF, A., MULLER, G. A. & STRUTZ, F. 2007. Potential role of fractalkine receptor expression in human renal fibrogenesis. *Kidney Int*, 72, 599-607.

KREJS, G. J. 2010. Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. *Dig Dis*, 28, 355-8.

KRUGER, B., LERCH, M. M. & TESSENOW, W. 1998. Direct detection of premature protease activation in living pancreatic acinar cells. *Lab Invest*, 78, 763-4.

KRUKEMEYER M G , S. H. U. 2005, Georg Thieme Verlag. Chirurgische Forschung.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

LAIRD, J. M., MARTINEZ-CARO, L., GARCIA-NICAS, E. & CERVERO, F. 2001. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. *Pain*, 92, 335-42.

LAMPEL, M. & KERN, H. F. 1977. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 373, 97-117.

LANKISCH, P. G., BURCHARD-RECKERT, S. & LEHNICK, D. 1999. Underestimation of acute pancreatitis: patients with only a small increase in amylase/lipase levels can also have or develop severe acute pancreatitis. *Gut*, 44, 542-4.

LANKISCH, P. G., BURCHARD-RECKERT, S., PETERSEN, M., LEHNICK, D., SCHIRREN, C. A., KOHLER, H., STOCKMANN, F., PEIPER, H. J. & CREUTZFELDT, W. 1996. Morbidity and mortality in 602 patients with acute pancreatitis seen between the years 1980-1994. *Z Gastroenterol*, 34, 371-7.

LEACH, S. D., MODLIN, I. M., SCHEELE, G. A. & GORELICK, F. S. 1991. Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin. *J Clin Invest*, 87, 362-6.

LECH MM, A. G. 1995. Tierexperimentelle Modelle. Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart, .

LERCH MM, A. G. 1994. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Dig Surg* 11.

LERCH, M. M. & GORELICK, F. S. 2000. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Med Clin North Am*, 84, 549-63, viii.

LERCH, M. M., SALUJA, A. K., RUNZI, M., DAWRA, R. & STEER, M. L. 1995. Luminal endocytosis and intracellular targeting by acinar cells during early biliary pancreatitis in the opossum. *J Clin Invest*, 95, 2222-31.

LINDIA, J. A., MCGOWAN, E., JOCHNOWITZ, N. & ABBADIE, C. 2005. Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. *J Pain*, 6, 434-8.

LÖSCHER, U. F. R. K. R. W. 2006. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, Parey.

LUCAS, A. D., BURSILL, C., GUZIK, T. J., SADOWSKI, J., CHANNON, K. M. & GREAVES, D. R. 2003. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation*, 108, 2498-504.

MAYERLE, J., STIER, A., LERCH, M. M. & HEIDECKE, C. D. 2004. [Chronic pancreatitis. Diagnosis and treatment]. *Chirurg*, 75, 731-47; quiz 748.

MENGER, M. D., PLUSCZYK, T. & VOLLMAR, B. 2001. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 8, 187-94.

MILLAN, M. J. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57, 1-164.

MILLIGAN, E. D., SLOANE, E. M. & WATKINS, L. R. 2008. Glia in pathological pain: a role for fractalkine. *J Neuroimmunol*, 198, 113-20.

MILLIGAN, E. D., ZAPATA, V., CHACUR, M., SCHOENIGER, D., BIEDENKAPP, J., O'CONNOR, K. A., VERGE, G. M., CHAPMAN, G., GREEN, P., FOSTER, A. C., NAEVE, G. S., MAIER, S. F. & WATKINS, L. R. 2004. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci*, 20, 2294-302.

MOSER, B. & LOETSCHER, P. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*, 2, 123-8.

MULLER, M. W., FRIESS, H., BEGER, H. G., KLEEFF, J., LAUTERBURG, B., GLASBRENNER, B., RIEPL, R. L. & BUCHLER, M. W. 1997. Gastric emptying following pylorus-preserving Whipple and duodenum-preserving pancreatic head resection in patients with chronic pancreatitis. *Am J Surg*, 173,

257-63.

NELSON R. W., C. G. C. 2006, Elsevier, Urban & Fischer Verlag. *Innere Medizin der Kleintiere*.

NIEDERAU, C., FERRELL, L. D. & GRENDALL, J. H. 1985. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology*, 88, 1192-204.

NISHIYORI, A., MINAMI, M., OHTANI, Y., TAKAMI, S., YAMAMOTO, J., KAWAGUCHI, N., KUME, T., AKAIKE, A. & SATOH, M. 1998. Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Lett*, 429, 167-72.

OH, D. J., DURSUN, B., HE, Z., LU, L., HOKE, T. S., LJUBANOVIC, D., FAUBEL, S. & EDELSTEIN, C. L. 2008. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294, F264-71.

OMARY, M. B., LUGEA, A., LOWE, A. W. & PANDOL, S. J. 2007. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*, 117, 50-9.

OTSUKI, M., YAMAMOTO, M. & YAMAGUCHI, T. 2010. Animal models of chronic pancreatitis. *Gastroenterol Res Pract*, 2010, 403295.

PARK, H. W., AHN, S. H., KIM, S. J., SEO, J. M., CHO, Y. W., JANG, S. H., HWANG, S. J. & KWAK, S. Y. 2011. Changes in spinal cord expression of fractalkine and its receptor in a rat model of disc herniation by autologous nucleus pulposus. *Spine (Phila Pa 1976)*, 36, E753-60.

PEZZILLI, R., ZERBI, A., DI CARLO, V., BASSI, C. & DELLE FAVE, G. F. 2010. Practical guidelines for acute pancreatitis. *Pancreatology*, 10, 523-35.

RAGHAVENDRA, V., TANGA, F. & DELEO, J. A. 2003. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 624-30.

RENNER, I. G., WISNER, J. R., JR. & RINDERKNECHT, H. 1983. Protective effects of exogenous secretin on ceruletide-induced acute pancreatitis in the rat. *J Clin Invest*, 72, 1081-92.

REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, 17, 208-12.

RIMANIOL, A. C., TILL, S. J., GARCIA, G., CAPEL, F., GODOT, V., BALABANIAN, K., DURAND-GASSELIN, I., VARGA, E. M., SIMONNEAU, G., EMILIE, D., DURHAM, S. R. & HUMBERT, M. 2003. The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 112, 1139-46.

SAEDERUP, N., CHAN, L., LIRA, S. A. & CHARO, I. F. 2008. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation*, 117, 1642-8.

SALUJA, A. K., SALUJA, M., PRINTZ, H., ZAVERTNIK, A., SENGUPTA, A. & STEER, M. L. 1989. Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 8968-71.

SALUJA, A. K. & STEER, M. L. P. 1999. Pathophysiology of pancreatitis. Role of cytokines and other mediators of inflammation. *Digestion*, 60 Suppl 1, 27-33.

SAMBROOK J., F. E. F., MANIATIS T. 1989. Molecular Cloning.

SAND, J. & NORDBACK, I. 2011. [Pain caused by chronic pancreatitis].

Duodecim, 127, 995-1001.

SARLES, H. 1986. Etiopathogenesis and definition of chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 31, 91S-107S.

SCHEELE, G., ADLER, G. & KERN, H. 1987. Exocytosis occurs at the lateral plasma membrane of the pancreatic acinar cell during supramaximal secretagogue stimulation. *Gastroenterology*, 92, 345-53.

SCHMID, S. W., UHL, W., FRIESS, H., MALFERTHEINER, P. & BUCHLER, M. W. 1999. The role of infection in acute pancreatitis. *Gut*, 45, 311-6.

SCHMIDT, H. & CREUTZFELDT, W. 1970. Calciphylactic pancreatitis and pancreatitis in hyperparathyroidism. *Clin Orthop Relat Res*, 69, 135-45.

SCHNEIDER, L., PIETSCHMANN, M., HARTWIG, W., HACKERT, T., MARCOS, S. S., LONGERICH, T., GEBHARD, M. M., BUCHLER, M. W. & WERNER, J. 2009. Alcohol pretreatment increases hepatic and pulmonary injury in experimental pancreatitis. *Pancreatology*, 9, 258-66.

SEGERER, S., HUGHES, E., HUDKINS, K. L., MACK, M., GOODPASTER, T. & ALPERS, C. E. 2002. Expression of the fractalkine receptor (CX3CR1) in human kidney diseases. *Kidney Int*, 62, 488-95.

SIMPSON, K. W., SIMPSON, J. W., LAKE, S., MORTON, D. B. & BATT, R. M. 1991. Effect of pancreatectomy on plasma activities of amylase, isoamylase, lipase and trypsin-like immunoreactivity in dogs. *Res Vet Sci*, 51, 78-82.

SOLANKI, N. S. & BARRETO, S. G. 2011. Fluid therapy in acute pancreatitis. A systematic review of literature. *JOP*, 12, 205-8.

STEER, M. L. 1998. Frank Brooks memorial Lecture: The early intraacinar cell events which occur during acute pancreatitis. *Pancreas*, 17, 31-7.

STEER, M. L., WAXMAN, I. & FREEDMAN, S. 1995. Chronic pancreatitis. *N Engl J Med*, 332, 1482-90.

STEINER, J. M. 2006, Mar 1. Is it pancreatitis? *Veterinary Medicine*, pp 158-167.

STEVENS, T., CONWELL, D. L. & ZUCCARO, G. 2004. Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J Gastroenterol*, 99, 2256-70.

SUN, S., CAO, H., HAN, M., LI, T. T., PAN, H. L., ZHAO, Z. Q. & ZHANG, Y. Q. 2007. New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *Pain*, 129, 64-75.

SUTER P. F, K. B. 2006 Georg Thieme Verlag. *Praktikum der Hundeklinik*.

SVENSSON, C. I. & BRODIN, E. 2010. Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets. *Mol Interv*, 10, 25-38.

TACKE, F., ALVAREZ, D., KAPLAN, T. J., JAKUBZICK, C., SPANBROEK, R., LLODRA, J., GARIN, A., LIU, J., MACK, M., VAN ROOIJEN, N., LIRA, S. A., HABENICHT, A. J. & RANDOLPH, G. J. 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 117, 185-94.

TATTERSALL, S. J., APTE, M. V. & WILSON, J. S. 2008. A fire inside: current concepts in chronic pancreatitis. *Intern Med J*, 38, 592-8.

TENNER, S., SICA, G., HUGHES, M., NOORDHOEK, E., FENG, S., ZINNER, M. & BANKS, P. A. 1997. Relationship of necrosis to organ failure in severe acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 113, 899-903.

TRAVERSO, L. W. & LONGMIRE, W. P., JR. 1978. Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy. *Surg Gynecol Obstet*, 146, 959-62.

UOMO, G. & MANES, G. 2007. Risk factors of chronic pancreatitis. *Dig Dis*, 25, 282-4.

VERGE, G. M., MILLIGAN, E. D., MAIER, S. F., WATKINS, L. R., NAEVE, G. S. & FOSTER, A. C. 2004. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur J Neurosci*, 20, 1150-60.

VONLAUFEN, A., WILSON, J. S. & APTE, M. V. 2008. Molecular mechanisms of pancreatitis: current opinion. *J Gastroenterol Hepatol*, 23, 1339-48.

WALSH, R. N. & CUMMINS, R. A. 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*, 83, 482-504.

WASMUTH, H. E., ZALDIVAR, M. M., BERRES, M. L., WERTH, A., SCHOLTEN, D., HILLEBRANDT, S., TACKE, F., SCHMITZ, P., DAHL, E., WIEDERHOLT, T., HELLERBRAND, C., BERG, T., WEISKIRCHEN, R., TRAUTWEIN, C. & LAMMERT, F. 2008. The fractalkine receptor CX3CR1 is involved in liver fibrosis due to chronic hepatitis C infection. *J Hepatol*, 48, 208-15.

WHITCOMB, D. C., GORRY, M. C., PRESTON, R. A., FUREY, W., SOSSENHEIMER, M. J., ULRICH, C. D., MARTIN, S. P., GATES, L. K., JR., AMANN, S. T., TOSKES, P. P., LIDDLE, R., MCGRATH, K., UOMO, G., POST, J. C. & EHRLICH, G. D. 1996. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*, 14, 141-5.

YANG, X. P., MATTAGAJASINGH, S., SU, S., CHEN, G., CAI, Z., FOX-TALBOT, K., IRANI, K. & BECKER, L. C. 2007. Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway. *Circ Res*, 101, 1001-8.

YASUDA, M., ITO, T., OONO, T., KAWABE, K., KAKU, T., IGARASHI, H., NAKAMURA, T. & TAKAYANAGI, R. 2008. Fractalkine and TGF-beta1 levels reflect the severity of chronic pancreatitis in humans. *World J Gastroenterol*, 14, 6488-95.

YOSHIDA, K., TOKI, F., TAKEUCHI, T., WATANABE, S., SHIRATORI, K. & HAYASHI, N. 1995. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 40, 1561-8.

ZHUANG, Z. Y., KAWASAKI, Y., TAN, P. H., WEN, Y. R., HUANG, J. & JI, R. R. 2007. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain Behav Immun*, 21, 642-51.

ZIMMERMANN, A., GLOOR, B., KAPPELER, A., UHL, W., FRIESS, H. & BUCHLER, M. W. 2002. Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans. *Gut*, 51, 574-8.

ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121-7.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

AP	Akute Pankreatitis
ATF-2	Aktivieren Transkriptionsfaktor 2
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CB2	Cannabinoid receptor 2
CCD-Kamera	<i>Charge-coupled Device</i> -Kamera
CCK	Cholezystokinin
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCR5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>
CD1a ⁺	<i>Cluster of Differentiation</i> „Unterscheidungsgruppen“ immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
CH	Schweiz
cKO	Kontrolle knock-out CX3CR1 ^{-/-}
COX	Cyclooxygenase
CP	chronische Pankreatitis
cPLI	<i>Canine-Pancreatic-Lipase-Immunoreactivity</i>
cWT	Kontrolle Wild-Typ
CX3CR1	Fractalkin-Rezeptor
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	<i>dorsal-root-ganglion</i> (Hinterhorn ganglien)
ECL	<i>enhanced Chemolumineszenz</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FIP	Feline-Infektiöse-Peritonitis
fPLI	<i>feline Pancreatic Lipase Immunoreactivity</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GER	Deutschland

h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
i.m	intra muskulär
i.v	intra venös
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IBD	<i>Inflammatory-Bowel-Disease</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IL-	Interleukin-
iNOS	induzierbare Isoform Stickoxid-Synthase
KO	<i>Knock-out</i>
MCP1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
mN	Millinewton
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen (Lymphozyten)
ns.	nicht signifikant
P2x4	P2X purinoceptor 4
p38-MAPK	<i>P38 mitogen-activated protein kinases</i>
PBLs	peripheren Blut-Lymphozyten
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
P-ERK	<i>phosphorylate-extracellular-signal-regulated kinases</i>
PGE2	Prostaglandin E2
PSC	<i>Pancreatic stellate cells</i>
PSTI	<i>Pancreatic secretory trypsin inhibitor</i>
PTEC	epitheliale Zellen des proximal tubulärere
PVDF	Polyvinylidene Fluoride

qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	<i>sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
TBST	<i>Tris-buffered-saline with Tween20</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
T-Zellen	T(Tymus)-Lymphozyten
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
WT	Wild-Typ
ZNS	Zentralnervensystem
ZPF	Zentrum für Präklinische Forschung
α -SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb1: Hund mit Pankreatitis
- Abb2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion in spinaler Microglia nach Nervenstimulation
- Abb3: Schematische Darstellung der Fractalkin Chemotaxis
- Abb4: Multibelle Rolle des Fractalkin im Krankheitsprozess
- Abb5: Beteiligung von Fractalkin und CX3CR1 im zentralen und peripheren neuropathischen Schmerzmechanismus
- Abb6: Einfluss von Fraktalkin und CX3CR1 in der chronischen Pankreatitis
- Abb7: Zeittafel; Schematische Darstellung des akuten Pankreatitis Versuchsablaufes
- Abb8: Zeittafel; Schematische Darstellung des chronischen Pankreatitis Versuchsablaufes
- Abb9: Open-Field-Box
- Abb10: Beispiel der computerunterstützten Auswertung der Laufstrecke
- Abb11: Beispiel einer Auswertungstabelle durch den Von-Frey-Filament Test
- Abb12: Darstellung der Verteilung der Proben
- Abb13: Beispiel der computerunterstützten Auswertung mittels Image J
- Abb14: Exemplarische Darstellung der Auswertung mittels Image J des Hinterhorns
- Abb15: Übersicht der Versuchs- und Kontrollgruppen
- Abb16: Vergleichende morphologische Darstellung vom Normal Pankreas (A), akute Pankreatitis (B) und chronische Pankreatitis (C).
- Abb17: Lichtmikroskopische Beispielbilder der cWT- (A, D), WT- (B, E) und KO- (C, F) Gruppe aus dem Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis.
- Abb18: Beispielbilder von Semidünnschnitten der cWT- (A, D), WT- (B, E) und KO- (C, F) Gruppe aus dem Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis.
- Abb19: Lichtmikroskopische Beispielbilder der cWT- (A, D), WT- (B, E) und KO- (C, F) Gruppe aus dem Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis.
- Abb20: Beispielbilder von Semidünnschnitten der cWT- (A, D), WT- (B, E) und KO- (C, F) Gruppe aus dem Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis.
- Abb21: Beispielbilder der intrapankreatischen Vakuolen.
- Abb22: Graphische Darstellung der intrapankreatischen Vakuolenanzahl.
- Abb23: Beispielbilder von anilingefärbten Schnitten der cWT- (A), WT- (B) und KO- (C) Gruppe

aus dem Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis.

Abb24: Beispielbilder der IHC gegen α -smooth-muscle-actin.

Abb25: Quantitative Darstellung der immunhistochemische Analyse von α -smooth-muscle-actin.

Abb26: REM und TEM Vergleichende Übersicht CP und AP.

Abb27: TEM Beispielbilder der akuten Pankreatitis.

Abb28: TEM Beispielbilder der chronischen Pankreatitis.

Abb29: REM Vergleichende Darstellung von NP, AP und CP.

Abb30: REM pathologische Veränderungen der Akuten Pankreatitis.

Abb31: REM pathologische Veränderungen der chronischen Pankreatitis.

Abb32: Graphische Darstellung des Flüssigkeitsverlustes im Pankreasgewebe (Ödem).

Abb33: Graphische Darstellung der α -Amylase und Lipase Werte im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis.

Abb34: Graphische Darstellung der Amylase und Lipase Werte im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis.

Abb35: Graphische Darstellung der Histopathomorphologische Analyse nach Spormann

Abb36: Graphische Darstellung des Aufrichtungsverhaltens im Versuchsverlauf der akuten Pankreatitis.

Abb37: Graphische Darstellung der Verhaltensweisen Putzen, Sprünge, bauchwärts blicken, kratzen, Defäkation und Urinieren beim Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis.

Abb38: Graphische Darstellung der Laufstrecke im Versuchsverlauf.

Abb39: WT und KO Vergleich im Von-Frey-Filament-Test im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis.

Abb40: WT und AK Vergleich im Von-Frey-Filament-Test im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis.

Abb41: cWT und cKO Vergleich im Von-Frey-Filament-Test im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis.

Abb42: Graphische Darstellung des Körpergewichtsverlust im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis.

Abb43: Graphische Darstellung des Aufrichtungsverhaltens im chronischen-Versuchsverlauf.

Abb44: Graphische Darstellung der Verhaltensweisen Putzen, Sprünge, Kratzen, Bauchwärts blicken, Defäkation, Urinieren beim Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis.

Abb45: Graphische Darstellung der Laufstrecke im chronischen Pankreatitis Versuchsverlauf.

Abb46: Von-Frey-Filament-Test (CP) von WT und KO im Vergleich.

Abb47: Von-Frey-Filament-Test (CP) von cWT und cKO im Vergleich.

Abb48: Graphische Darstellung der Körpergewichtszunahme im Versuchsansatz zur chronischen Pankreatitis.

Abb49: Beispielbilder der IHC gegen p-ERK.

Abb50: Quantitative Darstellung der immunhistochemische Analyse von p-ERK.

Abb51: Gewebe-Western-Blot p-ERK.

Abb52: Auswertung des Gewebe-Western-Blot p-ERK

Abb53: Wechselwirkung zwischen Neuron, Microglia und Astrozyt im ZNS modifiziert von (Svensson and Brodin, 2010).

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle1: Spormann-Score

Tabelle2: Semi-quantitative Analyse der Transmissions Elektronen Mikroskop Bilder

Tabelle3: Semi-quantitative Analyse der Raster Elektronen Mikroskop Bilder

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn PD Dr. Güralp O. Ceyhan für die Überlassung des sehr interessanten Themas und für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung des Projektes ganz herzlich danken. Durch seine Faszination und außerordentliches Interesse an meiner Arbeit, konnte ich mich schnell mit diesem Projekt identifizieren.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Kaspers, der meine Forschung stets unterstützt hat. Außerdem besten Dank für das Interesse und die Betreuung meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei der gesamten Arbeitsgruppe (*Scheihan-Warriors*) bedanken. Die wöchentlichen *Lab-Meetings* haben einen wesentlichen Teil dazu beigetragen das mein Projekt zügig und ohne Probleme durchgeführt werden konnte. Auch wenn ich demnächst nicht mehr im Labor arbeite, so werde ich doch immer einer von euch bleiben.

Ein großer Dank gilt auch Frau Ulrike Bourquain die mir gerade in der Anfangszeit sehr geholfen hat mich im Labor zurechtzufinden.

Danken möchte ich auch Frau Nissen und Steffen Khler, die mit mir tagelang am Elektronen-Mikroskop saßen.

Außerdem danke ich Jean Mller, der durch seine Meinung einen wesentlichen Beitrag dazu geleistet hat überhaupt eine Promotionsarbeit zu schreiben.

Besonderer Dank gilt dem Hund „Paula“ von Yvonne Welpmann.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie die mich durchgängig während meines Studiums und der Promotionsarbeit unterstützt haben. Und hierbei besonders meinem Bruder der immer für mich da war.